



Ministero delle Attività Produttive
Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi
Ufficio G2

REC'D 30 APR 2003

WIPO PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: **Invenzione Industriale**
RM2002 A 000115
N.



*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

Roma, il **21 GEN. 2003**

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

IL DIRIGENTE

Elena Carrelli
Sig.ra E. MARINELLI

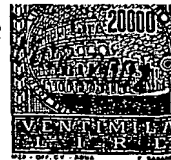
BEST AVAILABLE COPY

AL MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITA' AL PUBBLICO

MODULO A



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione Plantechno S.r.l. N.G. SR
Residenza Vicomosciano (Cremona) Italia I codice 01080070194
2) Denominazione _____
Residenza _____ codice _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome e nome de Benedetti Fabrizio ed altri cod. fiscale _____
denominazione studio di appartenenza SOCIETA' ITALIANA BREVETTI S.p.A.
via Piazza di Pietra n. 39 città ROMA cap 00186 (prov) RM

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____
classe proposta (sez/cl/scl) _____ gruppo/sottogruppo _____ / _____

D. TITOLO

"Espressione di enzimi lisosomiali in seme".ANTICIPATA ACCESSIBILITA' AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA ____/____/____

N. PROTOCOLLO

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome
1) FOGHER Corrado 3) _____
2) REGGI Serena 4) _____

F. PRIORITA'

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R	SCIOGLIMENTO RISERVE Data N° Protocollo
1) _____	_____	_____	____/____/____	_____	____/____/____/____
2) _____	_____	_____	____/____/____	_____	____/____/____/____

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

lettera d'incarico segue

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.	PROV	n. pag.	riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
Doc. 1) 2	PROV	69	
Doc. 2) 2	PROV	08	disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)
Doc. 3) 0	RIS		lettera d'incarico
Doc. 4) 0	RIS		designazione inventore
Doc. 5) 0	RIS		documenti di priorità con traduzione in italiano
Doc. 6) 0	RIS		autorizzazione o atto di cessione
Doc. 7) 0			nominativo completo del richiedente

attestati di versamento, totale Euro quattrocentosettantadue/56=

obbligatorio

COMPILATO IL 01 / 03 / 2002

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

CONTINUA (SI/NO) NODEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA (SI/NO) SI

CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA ARTIGIANATO E AGRICOLTURA DI

ROMAcodice 58

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

RM 2002 A 000115

Reg. A

L'anno duemiladue, il giorno primodel mese di marzoIl (I) richiedente (I) sopraindicato (I) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraripartito.

ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE



L'UFFICIALE ROGANTE

L'Ufficiale Rogante
Silvia Anelli

RM 2002 A 000115

SIB EI3141R

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:

"ESPRESSIONE DI ENZIMI LISOSOMIALI IN SEME"

a nome di Plantechno S.r.l.

di Vicomoscato, Cremona (Italia)

_____._____
DESCRIZIONE

Campo tecnico dell'invenzione

La presente invenzione riguarda la produzione di piante transgeniche in grado di esprimere, nei tessuti di riserva dei semi, un enzima lisosomiale in forma enzimaticamente attiva e in quantità appropriate per l'utilizzo di tale enzima nella terapia enzimatica sostitutiva.

In particolare, la presente invenzione riguarda piante e semi contenenti tale enzima.

Stato della tecnica anteriore

Le malattie lisosomiali rappresentano un'ampia classe di malattie genetiche umane determinate da difetti nel funzionamento di specifici enzimi lisosomiali. I lisosomi sono i principali organelli degradativi delle cellule animali e sono di importanza critica nella degradazione di macromolecole e nel riciclo dei loro componenti



monomerici. Questi organelli delimitati da membrana presentano un pH acido e contengono una varietà di nucleasi, proteasi, fosfatasi ed enzimi degradativi di polisaccaridi, mucopolisaccaridi e lipidi. Un difetto in una specifica idrolasi acida determina un aberrante accumulo del substrato nei lisosomi causando una varietà di patologie tra cui potremmo ricordare la malattia di Tay-Sachs, dovuta ad un difetto dell'enzima β -N-esosaminidasi, le Mucopolisaccaridosi (MPS) che sono un gruppo di malattie recessive dovute ad un difetto nella degradazione di glicosaminoglicani solforati complessi, la malattia di Anderson-Fabry, dovuta ad una deficienza dell'enzima α -galattosidasi A che provoca l'accumulo di globotriaosilceramide soprattutto nelle cellule endoteliali microvascolari dei reni, la malattia di Pompe, dovuta ad una deficienza dell'enzima α -glucosidasi acida che provoca un accumulo intralisosomiale di glicogeno e la malattia di Gaucher, dovuta a difetti nell'enzima glucocerèbrosidasi (β -glucosidasi acida o GCB) che determina l'accumulo di glicosfingolipidi principalmente nelle cellule delle linee monocite-macrofago.

In particolare, la malattia di Anderson-Fabry è una malattia legata al cromosoma X dominante risultante dalla deficienza nel funzionamento dell'enzima α -galattosidasi A (α -Gala o GLA) che porta all'accumulo progressivo di globotriaosilceramide (GL-3) e glicosfingolipidi correlati che porta a proteinuria nei maschi giovani e successivamente, con la crescita, ad insufficienza renale.

L' α -galattosidasi A umana è una glicoproteina omodimerica, con quattro possibili siti di glicosilazione, di 429 amminoacidi il cui peptide segnale è rappresentato dai 31 residui N-terminali. La sequenza del cDNA della GLA è stata pubblicata da Tsuji S. et al., 1987, Eur. J. Biochem., 165(2), 275-280.

La malattia di Pompe, o malattia di accumulo del glicogeno di tipo II, è una miopatia metabolica autosomica recessiva causata da una deficienza dell'enzima α -glucosidasi acida (GAA) che porta ad un accumulo di glicogeno in quasi tutti i tessuti danneggiando, in modo particolare, il cuore ed i muscoli scheletrici.

L' α -glucosidasi acida è una glicoproteina con sette possibili siti di glicosilazione, di 952 amminoacidi

il cui peptide segnale è rappresentato dai 69 residui N-terminali. La sequenza del cDNA è stata pubblicata da Hoefsloot L. H. et al., 1988, EMBO JOURNAL 7(6), 1697-1704.

Infine, la malattia di Gaucher è un disordine autosomale recessivo causato da una deficienza di glucocerebrosidasi, un enzima che è richiesto per la degradazione a livello lisosomiale di lipidi contenenti zuccheri legati in modo covalente (Brady et al. 1965, J. Biol. Chem., 240 : 39-43). In assenza di glucocerebrosidasi il composto estremamente insolubile glucosilceramide (glucocerebroside) si accumula nei lisosomi portando alla sintomatologia della malattia.

La glucocerebrosidasi umana è una glicoproteina di peso molecolare variabile da 58 a 70 kDa, con cinque possibili siti di glicosilazione. La sequenza completa del cDNA è stata riportata (Sorge et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. 82 : 7289-7293). La regione di lettura aperta, di 1545 pb più diversi introni, codifica per una proteina di 515 aminoacidi compresi i 19 aminoacidi del peptide segnale.

Il successo raggiunto con la terapia enzimatica delle malattie lisosomiali tipo la malattia di Gaucher ha evidenziato la necessità di metodi di

produzione degli enzimi lisosomiali in genere sempre più efficaci, più sicuri e più economici.

Sino ad oggi, alcuni di questi enzimi sono stati estratti direttamente da placenta umana o prodotti, mediante ingegneria genetica, in colture cellulari di cellule di ovario di criceto (CHO). Entrambi i metodi di produzione indicati, oltre ad avere costi molto elevati, implicano rischi per il paziente. Per quanto riguarda l'utilizzo di enzimi estratti da placenta, infatti, sono state riscontrate conseguenti infezioni virali, mentre per quanto riguarda l'utilizzo di enzimi estratti da colture cellulari di CHO è stata riscontrata, nel 15% dei pazienti, la produzione di anticorpi specifici contro il prodotto la cui origine potrebbe essere legata al sistema di produzione utilizzato.

Solo recentemente, alcuni enzimi lisosomiali sono stati prodotti in piante geneticamente modificate.

La produzione in piante transgeniche di enzimi lisosomiali umani è percorribile per risolvere i problemi di sicurezza, infezioni virali, reazioni immunitarie, resa e costo di produzione.

Nel brevetto U.S. 5,929,304 è riportata la produzione di alcuni enzimi lisosomiali



(glucocerebrosidasi umana e α -L-iduronidasi umana) in foglia, la cui realizzazione ottimale è ottenuta in tabacco.

Il tabacco, infatti, è particolarmente indicato come sistema modello per la produzione di proteine ricombinanti ad elevato valore. Geni eterologhi possono essere introdotti nelle cellule totipotenti di tabacco utilizzando ceppi non patogeni di *Agrobacterium tumefaciens*. La crescita successiva e la differenziazione delle cellule trasformate porta all'ottenimento di piante transgeniche stabili. L'ottenimento di grandi quantità di materiale fogliare di piante transgeniche, si realizza in 6-7 settimane mentre la disponibilità di seme transgenico di prima generazione, in quantità estremamente superiori al materiale fogliare, si ha in altri 2-3 mesi.

Il brevetto U.S. 5,929,304 descrive l'espressione di alcuni enzimi lisosomiali in piante di tabacco. Gli enzimi vengono prodotti essenzialmente in foglia da piante trasformate mediante l'uso di vettori contenenti il promotore MeGa (derivante dal promotore di pomodoro HMG2) o il promotore del virus del mosaico del cavolfiore (CaMV) 35S. Il brevetto U.S. 5,929,304 riporta, tra

i promotori esemplificati come adatti per la realizzazione dell'invenzione oltre a quelli sopracitati, anche il promotore rbcS, il promotore della proteina a/b di legame della clorofilla, il promotore AdhI ed il promotore NOS. Secondo quanto descritto in detto brevetto, il promotore utilizzato può essere costitutivo o inducibile. In tutti gli esempi riportati nel brevetto si descrive l'espressione in foglia della β -glucosidasi acida umana enzimaticamente attiva e della α -L-iduronidasi umana enzimaticamente attiva. L'espressione avviene in seguito a trasformazione di piante di tabacco con vettori contenenti oltre alla sequenza codificante per l'enzima desiderato, rispettivamente, il promotore MeGA che è un promotore inducibile meccanicamente, ed il promotore 35S che è un promotore costitutivo.

Come riportato negli esempi, la resa di glucocerebrosidasi umana in foglie di tabacco è pari a circa 1,5 mg di proteina estraibile per ogni 1000 mg di tessuto ovvero l'enzima ottenuto è pari allo 0,15% del peso del materiale fogliare di partenza. Tale risultato, ottenuto attraverso l'espressione in pianta, è indicato dagli inventori come la soluzione a lungo cercata per la produzione di enzimi

lisosomiali animali o umani in maniera da soddisfare la necessità esistente di detti enzimi nella terapia genica.

E' noto tuttavia, che la concentrazione di proteine in foglia è estremamente ridotta e, in ogni caso, inferiore a quella in seme. Inoltre va ricordato che, essendo gli enzimi proteine estremamente sensibili a fattori denaturanti, nel caso di espressione di enzimi in foglia, esiste un problema di stabilità che richiede la continua e tempestiva raccolta del tessuto fogliare dopo l'induzione meccanica del promotore, l'immediato congelamento a -20°C di detto tessuto e lo scarto di un enorme quantità di materiale nella fase di estrazione dell'enzima. Inoltre, l'espressione in foglia permette una produzione di proteine in quantità molto bassa, in ogni caso minore rispetto ad una produzione delle stesse in seme. Per questo motivo sarebbe opportuno fornire un sistema di espressione di enzimi lisosomiali seme specifico.

Per quanto gli insegnamenti del brevetto U.S 5,929,304 riguardino teoricamente anche l'espressione dell'enzima in altri tessuti vegetali oltre a quello fogliare, è stato verificato dai presenti inventori, nel tentativo di esprimere la

β -glucosidasi acida in seme, che il promotore 35S identificato nel suddetto brevetto come uno dei promotori adatti a tale scopo non è in grado di dirigere l'accumulo di una proteina stabile nel seme (Figura 12). Come riportato successivamente nell'esempio comparativo, sono state trasformate piante di tabacco utilizzando un vettore di espressione contenente la sequenza di cDNA del gene per la glucocerebrosidasi umana, codificante anche per la sequenza segnale nativa dell'enzima, sotto il controllo del promotore 35S. L'analisi mediante Western Blot in chemiluminescenza ha dimostrato l'assenza dell'enzima desiderato nei tessuti del seme. Il brevetto U.S 5,929,304 quindi, per quanto affermi l'idoneità del metodo descritto per l'espressione in seme, non fornisce, in realtà, all'esperto del ramo, gli insegnamenti necessari per realizzare tale espressione.

Espressione di proteine eterologhe in seme

Il seme rappresenta in assoluto l'organo vegetale più utilizzato dall'uomo per i suoi apporti calorici e proteici. La funzione di riserva, per la componente azotata, viene svolta da proteine particolari accumulate nei corpi proteici all'interno di compartimenti nei sistemi di



endomembrane cellulari. La quantità di proteine presenti nel seme varia da circa il 10-15% del peso del seme nei cereali a circa il 25-35% nelle leguminose, nel tabacco la quantità di proteine presenti nel seme è pari a circa il 20% del peso del seme. Per aumentare le rese di produzione di proteine espresse in pianta è dunque necessario dirigere l'accumulo della proteina nell'endosperma del seme.

E' stata descritta, nella domanda di brevetto internazionale WO-A-00/04146, a nome della stessa richiedente, l'espressione in seme della proteina lattoferrina. Tale risultato è stato ottenuto modificando piante di tabacco e di riso con vettori contenenti una cassetta di espressione. Questa comprende un promotore ed una sequenza di DNA codificante la sequenza segnale di proteine di riserva molto abbondanti nei semi ed espresse stadio-specificamente, cioè la β -conglucina o la globulina basica 7S, e una sequenza di DNA codificante per la lattoferrina. Nella domanda di brevetto WO-A-00/04146 vengono descritti in maniera dettagliata i vettori utilizzati ed i promotori selezionati.

La lattoferrina è una glicoproteina in grado di legare il ferro normalmente espressa nel latte umano. Tale proteina presenta una stabilità estremamente elevata dato che soluzioni contenenti lattoferrina possono essere trattate anche per 5 minuti a 90°C senza che si riscontrino perdite significative nell'attività proteica. Benché la domanda di brevetto WO 00/04146 proponga, in via ipotetica anche l'espressione di proteine con attività genericamente enzimatica utilizzando il metodo attuato con la lattoferrina, tale possibilità resta puramente teorica poiché non viene fornito nessun dato che supporti la validità del sistema utilizzato in detta domanda di brevetto per l'espressione di enzimi funzionalmente attivi ed ancor meno di enzimi lisosomiali.

La domanda di brevetto WO-A-00/04146, non essendo in realtà diretta all'espressione di enzimi, trascura alcuni problemi di fondamentale rilievo relativi alla stabilità della proteina esogena espressa. Anzi, l'estrema stabilità della lattoferrina ed il fatto che nella lattoferrina la presenza di catene glicosidiche non naturali non influenzi il folding ed il funzionamento della proteina, non consentono affatto di prevedere che

l'utilizzo del sistema descritto nella domanda di brevetto WO-A-00/04146 permetta effettivamente di esprimere enzimi con un folding corretto e funzionalmente equivalenti all'enzima nativo. Inoltre, è noto che nel caso della β -glucosidasi acida la glicosilazione del primo dei cinque siti di glicosilazione presenti nell'enzima è essenziale per la formazione di un enzima attivo; nel caso dell' α -galattosidasi A è il terzo sito di glicosilazione che ha detta funzione e, nel caso dell' α -glucosidasi acida, è il secondo sito di glicosilazione quello essenziale per la formazione dell'enzima maturo.

Un altro problema è rappresentato dal fatto che l'instabilità proteica può essere dovuta a vincoli strutturali, ma può essere anche una conseguenza della localizzazione subcellulare. Per l'espressione di enzimi lisosomiali bisogna tenere conto del fatto che le cellule vegetali non contengono lisosomi ma utilizzano il vacuolo come un analogo funzionale di queste vescicole acidiche per la degradazione dei polimeri. La via principale di trasferimento degli enzimi solubili ai lisosomi, nell'uomo, implica l'interazione con i recettori mannosio-6-fosfato (MPR). Le proteine lisosomiali sono indirizzate verso il reticolo endoplasmico (RE) da peptidi

segnale N-terminali, e glicosilate durante il trasferimento all'apparato del Golgi. In questo organello i glicani N-associati degli enzimi destinati ai lisosomi sono fosforilati selettivamente a uno o più residui di mannosio. A questo punto i glicani mannosio-6-fosfato si possono legare ai recettori di membrana che assicurano l'internalizzazione della glicoproteina.

Le piante mancano del sistema di targeting basato sul mannosio-6-fosfato, non presentano MPR e non sembrano produrre glicani fosforilati. Siccome gli enzimi lisosomiali funzionano in un ambiente acido (<pH 4) e sono instabili a valori di pH più alti (7); il pH (5.8) del compartimento apoplastico (extracellulare) vegetale fa sì che la secrezione di detti enzimi in detto compartimento sia ideale per la loro stabilità. Nonostante si possa supporre che le glicoproteine lisosomiali umane possano essere secrete nello spazio apoplastico (che sarebbe particolarmente adatto all'immagazzinamento di enzimi lisosomiali), non si può affatto prevedere che il sistema descritto nella domanda di brevetto sopracitata sia in grado di veicolare gli enzimi lisosomiali nello spazio apoplastico del tessuto di riserva del seme. Tale localizzazione sarebbe in



grado di conferire stabilità agli enzimi espressi per i motivi sopramenzionati; infatti, la localizzazione precisa degli enzimi lisosomiali all'interno dei tessuti vegetali è di fondamentale importanza per la stabilità dell'enzima prodotto.

Inoltre, come è noto, gli enzimi, a differenza della lattoferrina, sono nella maggior parte dei casi proteine estremamente instabili che richiedono conservazione a basse temperature e che vengono facilmente inattivate dal calore o da agenti denaturanti.

Alla luce di questi interrogativi, l'esperto del settore difficilmente avrebbe potuto trovare e riconoscere nella domanda WO-A-00/04146 il supporto tecnico necessario ad esprimere con successo enzimi lisosomiali attivi in organi di riserva di semi vegetali.

Scopo della presente invenzione è quello di offrire una soluzione ai problemi lasciati irrisolti dallo stato della tecnica sopramenzionato. In particolare, scopo della presente invenzione è produrre un sistema di espressione che permetta la formazione di piante transgeniche in grado di esprimere in semi un enzima lisosomiale stabile ed in forma

enzimaticamente attiva. Ulteriore scopo della presente invenzione è quello di produrre tale enzima in quantità superiore a quella ottenibile in foglia e cioè superiore a 1,5 mg per grammo di tessuto utilizzato.

Sommario dell'invenzione

L'invenzione si basa sull'inattesa scoperta che enzimi lisosomiali, di origine animale o umana, possono essere vantaggiosamente espressi negli organi di riserva dei semi in forma stabile (la stabilità è superiore ai 12 mesi nei semi opportunamente conservati), enzimaticamente attiva ed in quantità elevata ed idonea ad un utilizzo medico di detti enzimi.

Tale quantità è non inferiore allo 0.8%, preferibilmente all'1%. In una forma ottimale la resa è di circa l'1,5% delle proteine totali del seme, in modo da poter utilizzare detti semi come mezzi di immagazzinamento e conservazione di tale enzima.

Inoltre, a prescindere dalla quantità di enzima espresso, l'immagazzinamento efficiente dell'enzima per periodi molto lunghi (superiori ai 12 mesi),

consente di programmare la produzione nei periodi stagionali più favorevoli, cosa non possibile con la produzione in foglia che richiede un'immediata estrazione e purificazione dell'enzima.

Nell'ambito della presente descrizione, con il termine "forma enzimaticamente attiva" si intende che l'enzima è funzionalmente attivo e che la sua attività è equivalente a quella dell'enzima nativo. E' pertanto oggetto della presente invenzione una pianta geneticamente trasformata in grado di produrre un enzima lisosomiale di origine animale o umana caratterizzata dal fatto che:

-detta pianta è trasformata mediante l'uso di un vettore ricombinante contenente:

- a. un promotore di un gene vegetale specifico per l'espressione negli organi di riserva del seme e stadio-specifico;
- b. una sequenza di DNA codificante per la sequenza segnale di una proteina vegetale in grado di indirizzare detto enzima lisosomiale agli organi di riserva del seme ed assicurare le modifiche post-traduzionali necessarie per l'espressione dell'enzima in forma attiva;
- c. una sequenza di DNA codificante detto enzima lisosomiale privata delle sequenze

codificanti la sequenza segnale dell'enzima nativo e la sequenza codificante il segnale di poliadenilazione nativo;

d. ed un segnale di poliadenilazione;

-detto enzima è espresso nei tessuti di riserva del seme in forma enzimaticamente attiva nella quantità di almeno lo 0.8%, preferibilmente l'1%, delle proteine totali del seme.

Sono anche oggetto della presente invenzione il metodo per produrre detta pianta trasformando cellule vegetali col vettore sopra descritto e rigenerando piante a partire da dette cellule trasformate, i semi prodotti da detta pianta, il metodo per produrre detti semi, il metodo di purificazione dell'enzima da detti semi, l'uso di detti semi per la preparazione di medicinali per la terapia enzimatica di sostituzione e l'uso di detti semi come mezzo di immagazzinamento e conservazione di un enzima lisosomiale in forma enzimaticamente attiva.

Descrizione dettagliata delle figure

Figura 1. La figura 1 illustra il plasmide denominato pGEM-GCB ottenuto dal clonaggio iniziale del gene GCB e utilizzato per il controllo della sequenza completa del gene amplificato. pGEM-GCB è



ottenuto clonando il frammento corrispondente al gene GCB avente la sequenza SEQ ID NO 1 (ottenuto clonando da RNA totale di placenta umana mediante RT-PCR con i primer aventi le SEQ ID NO 3 e 4) amplificato con i primer aventi le SEQ ID NO 4 e 5 nel plasmide pGEM®-T (Promega) nel sito di linearizzazione EcoRV e quindi delimitando il gene GCB tra siti SacI e SmaI presenti, rispettivamente, nei primer aventi SEQ ID NO 5 e 4. Il primer avente SEQ ID NO 5 consente di eliminare la parte della sequenza di DNA codificante la sequenza segnale umana da SEQ ID NO 1.

Figura 2. La figura 2 illustra il plasmide definito come pPLT2100 utilizzato per costruire il gene chimerico PGLOB-GCB. pPLT2100 è ottenuto inserendo tra i siti SmaI e SacI del polylinker del vettore pUC19 (EMBL Acc. N. X02514) il frammento corrispondente al gene GCB clonato nel plasmide della Figura 1 tagliato con gli stessi enzimi ed il promotore PGLOB (SEQ ID NO 6) più la sequenza codificante per la sequenza segnale della globulina basica di soia (SEQ ID NO 7) clonati tra i siti XbaI e BamHI.

Figura 3. La figura 3 illustra il plasmide denominato pPLT4000 ottenuto inserendo tra i siti

XbaI-SacI del plasmide pBI101 (Clontech) la cassetta PGLOB-GCB tagliata via con gli stessi enzimi (XbaI-SacI) dal vettore della Figura 2.

Figura 4. La figura 4 illustra il plasmide denominato pPLT4100 ottenuto inserendo tra i siti BamHI-SacI (blunt) del plasmide pBI101 (Clontech) la cassetta PGLOB-GLA comprendente il promotore PGLOB (SEQ ID NO 6), la sequenza segnale della globulina basica 7S di soia (SEQ ID NO 7) ed il cDNA del gene dell' α galattosidasi A umana (SEQ ID NO 8), indicata come GLA, deleto dei nucleotidi codificanti il peptide segnale (cioè deleto fino al nucleotide 116). La cassetta PGLOB-GLA è stata ottenuta costruendo plasmidi analoghi a quelli illustrati nelle figure 1 e 2 in cui il cDNA clonato è quello dell' α -galattosidasi A umana (SEQ ID NO 8) privato dei nucleotidi codificanti il peptide segnale utilizzando i primer aventi le sequenze SEQ ID NO 10 e SEQ ID NO 11 che aggiungono, rispettivamente, un sito di restrizione BamHI al 5' ed il sito di restrizione ECORV (blunt) al 3' del DNA amplificato.

Figura 5. La figura 5 illustra il plasmide denominato pPLT4200 ottenuto inserendo tra i siti SmaI-SacI (SacI è tagliato con l'isoschizomero

EcoCRI, blunt) del plasmide pBI101 (Clontech) la cassetta PGLOB-GAA comprendente il promotore PGLOB (SEQ ID NO 6), la sequenza segnale della globulina basica 7S di soia (SEQ ID NO 7) ed il cDNA del gene dell' α glucosidasi acida umana (SEQ ID NO 12) indicata come GAA delecto dei nucleotidi codificanti la sequenza segnale (cioè delecto fino al nucleotide 426). La cassetta PGLOB-GAA è stata ottenuta costruendo plasmidi analoghi a quelli illustrati nelle figure 1 e 2 in cui il cDNA clonato è quello dell' α -glucosidasi acida umana (SEQ ID NO 12), privato dei nucleotidi codificanti per il peptide segnale utilizzando i primer aventi le sequenze SEQ ID 14 e SEQ ID 15 che aggiungono, al 5' ed al 3' del DNA amplificato il sito di restrizione EcoRV (blunt).

Figura 6. La figura 6 riproduce il risultato di una elettroforesi su gel di agarosio del DNA risultante dalla amplificazione mediante PCR, eseguita con primer specifici per il gene della glucocerebrosidasi umana (SEQ ID NO 4 e 5), su DNA estratto da piante trasformate con il costrutto di Figura 3. Il frammento amplificato di circa 1500 paia di basi corrisponde al gene della glucocerebrosidasi umana trasformato in tabacco

presente nel genoma di quasi tutte le linee di tabacco ottenute resistenti alla kanamicina. Nel pozzetto della colonna S è stata caricata la scala di riferimento di peso molecolare: 1Kb ladder (Promega) (bande dal basso verso l'alto 1000bp, 1500bp, 2000bp, 3000bp, 4000bp, 5000bp, 6000bp e 7000bp). Nei pozzetti delle colonne da 1 a 9 è stato caricato il prodotto dell'amplificazione del DNA di nove piante di tabacco trasformate. Nel pozzetto della colonna C è stato caricato il prodotto dell'amplificazione eseguita sul DNA di piante di tabacco selvatiche che non contengono una sequenza omologa amplificabile con gli stessi primer.

Figura 7. Riporta i risultati dell'analisi Northern eseguita su RNA estratto da semi immaturi (Days After Pollination, DAP, 20) di tabacco delle linee trasformate con il plasmide della Figura 3 e risultate positive al controllo PCR per la verifica della presenza del gene riportate in Figura 6. L'RNA totale estratto con il metodo Trizol® è stato caricato (10µg/pozzetto) su gel di agarosio, sottoposto ad elettroforesi, trasferito su membrana di nylon e ibridato con una sonda radioattiva ottenuta amplificando un frammento del gene della



glucocerebrosidasi umana. Nelle colonne da 1 a 8 è stato caricato RNA totale estratto da piante transgeniche, C- è il controllo negativo costituito da RNA totale di una pianta di tabacco di tipo selvatico, C+ è il controllo positivo costituito da RNA totale (15µg) estratto da placenta umana. Le dimensioni della banda evidenziata corrispondono a quelle attese per l'RNA messaggero del gene GCB. Nelle piante 5, 6 e 8 il gene non è trascritto.

Figura 8. Riporta un gel SDS-PAGE di proteine parzialmente purificate da semi delle piante di tabacco transgeniche trasformate con il plasmide della Figura 3 (colonne da 1 a 8) riportate nelle Figure 6 e 7 e l'analisi Western delle stesse. L'analisi è stata eseguita sull'estratto proteico grezzo totale (1 mg) di seme maturo, separato mediante elettroforesi SDS-PAGE. L'analisi è stata eseguita con tecniche di chemiluminescenza utilizzando come anticorpo primario un anticorpo policlonale di coniglio specifico per l'enzima della glucocerebrosidasi umana e, come anticorpo secondario, un anti-IgG di coniglio coniugato con perossidasi. Con C- è indicato il controllo negativo costituito da proteine estratte da seme di tabacco di tipo selvatico, con C+ è indicato il

controllo positivo costituito dall'enzima glucocerebrosidasi umana commerciale (50ng)

Figura 9. Riporta il profilo di espressione del promotore PGLOB nel seme di tabacco di una linea transgenica, che regola l'espressione del gene GCB nelle linee più produttive. Le diverse colonne contengono estratti proteici totali ottenuti dal seme di una stessa linea raccolto in periodi successivi dopo la fecondazione (DAP : day after pollination). La presenza della proteina corrispondente all'enzima glucocerebrosidasi umana è stata verificata mediante western Blot seguendo la stessa procedura indicata per la Figura 8. Colonna I: DAP 4; colonna II: DAP 9; colonna III: DAP 14; colonna IV: DAP 18; colonna V: DAP 22; colonna VI: maturazione completa; colonna C+: controllo positivo, 50 ng di prodotto commerciale; colonna C-: controllo negativo, estratto proteico totale di piante di tabacco di tipo selvatico.

Dai risultati mostrati in questa figura si può osservare come il promotore di soia PGLOB in tabacco ha un profilo di attivazione ottimale per la produzione di proteine ricombinanti dato che viene attivato dopo circa 10 giorni

dall'impollinazione e si esprime fino a maturazione.

Figura 10. Riporta i risultati del trattamento con enzimi deglicosilanti della proteina glucocerebrosidasi purificata da seme di tabacco. Colonna 1: enzima glucocerebrosidasi umana commerciale deglicosilato, colonna 2: controllo con proteine estratte da seme di tabacco di tipo selvatico; colonna 3: enzima purificato da seme e deglicosilato mediante trattamento con gli enzimi deglicosilanti; colonna 4: enzima purificato da seme e non sottoposto a deglicosilazione.

Figura 11. La figura 11 riproduce il risultato di una elettroforesi su gel di agarosio del DNA risultante dalla amplificazione mediante PCR, eseguita con primer specifici per il gene della α -galattosidasi A umana (SEQ ID NO 10 e 11), su DNA estratto da piante trasformate con il costrutto di Figura 4. Il frammento amplificato di circa 1200 paia di basi corrisponde al gene della α -galattosidasi A umana trasformato in tabacco presente nel genoma di quasi tutte le linee di tabacco ottenute resistenti alla kanamicina. Nel pozzetto della colonna S è stata caricata la scala di riferimento di peso molecolare: 1Kb ladder

(Promega) (bande dal basso verso l'alto 1000bp, 1500bp, 2000bp, 3000bp e 4000bp). Nei pozzetti delle colonne da 2 a 11 è stato caricato il prodotto dell'amplificazione del DNA di nove piante di tabacco trasformate. Nel pozzetto della colonna C è stato caricato il prodotto dell'amplificazione eseguita sul plasmide utilizzato per la trasformazione.

Figura 12. Western Blot relativo al controllo dell'espressione nel seme in due linee di tabacco trasformate con GCB sotto il controllo del promotore 35S e sequenza di DNA codificante la sequenza segnale del gene GCB umano. L'analisi western è stata eseguita con tecniche di chemiluminescenza utilizzando come anticorpo primario un anticorpo policlonale di coniglio specifico per l'enzima glucocerebrosidasi umana e, come anticorpo secondario, un anti-IgG di coniglio coniugato con perossidasi.

Colonna 1: glucocerebrosidasi umana purificata da placenta e deglicosilata (50 ng); colonna 2: glucocerebrosidasi umana purificata da placenta e non deglicosilata (50 ng); colonna 3: proteine totali (1 mg) estratte da seme della linea SR-S9; colonna 4: proteine totali (1 mg) estratte da seme



della linea SR-S10; colonna 5: proteine totali (1 mg) estratte da seme della linea SR-S11; colonna 6: proteine totali (1 mg) estratte da seme della linea SR-S12; colonna 7: proteine totali (1 mg) estratte da seme della linea SR-S13; colonna 8: proteine totali (1 mg) estratte da seme della linea SR-S14.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Gli enzimi lisosomiali secondo la presente invenzione includono, ma non sono ad essi limitati: l' α -N-acetilgalattosamminidasi, la lipasi acida, l'aril solfatasi A, l'aspartilglicosamminidasi, la ceramidasi, l' α -fucosidasi, l' α -galattosidasi A, la β -galattosidasi, la galattosilceramidasi, la glucocerebrosidasi, l' α -glucosidasi, la β -glucuronidasi, l'eparin N-solfatasi, la β -esosamminidasi, l'iduronato solfatasi, l' α -L-iduronidasi, l' α -mannosidasi, la β -mannosidasi, la sialidasi e la sfingomielinasi.

Detti enzimi sono noti all'esperto del settore così come le loro sequenze nucleotidiche e polipeptidiche. La sequenza codificante detti enzimi può essere isolata in accordo con un qualsiasi metodo noto. Un metodo preferito per isolare dette

sequenze si basa sulla tecnica della RT-PCR (PCR con trascrizione inversa). Primer adatti (che includano o meno la sequenza di DNA codificante la sequenza segnale nativa della proteina ed il segnale di poliadenilazione) possono essere disegnati partendo dalle sequenze note ed il cDNA del gene desiderato può essere clonato mediante RT-PCR da mRNA estratto da cellule di placenta. Le sequenze clonate che includono il DNA codificante la sequenza segnale nativa e/o il segnale di poliadenilazione possono essere successivamente modificate, mediante trattamenti enzimatici o mediante ulteriore amplificazione con PCR utilizzando primer adatti, in modo da rimuovere dette sequenze.

In una forma di realizzazione preferita della presente invenzione l'enzima lisosomiale è la β -glucosidasi acida (glucocerebrosidasi o GCB) umana. Il cDNA di detto enzima (SEQ ID NO 1), può essere clonato da mRNA di cellule di placenta utilizzando i primer aventi SEQ ID NO 3 e 4. Detto cDNA, che contiene la sequenza codificante per la sequenza segnale nativa della GCB può essere ulteriormente amplificato mediante PCR utilizzando i primer aventi SEQ ID NO 4 e 5, che escludono detta sequenza, ovvero i nucleotidi da 1 a 57 di SEQ ID

NO1 e che aggiungono siti di restrizione adatti ad un inserimento più facile dell'amplificato nel vettore ricombinante. La sequenza di poliadenilazione è già assente in SEQ ID NO 1.

In un'altra forma di realizzazione preferita della presente invenzione l'enzima lisosomiale è l' α -galattosidasi A umana (α -GalA o GLA). Il cDNA di detto enzima (SEQ ID NO 8) già delecto della parte codificante il peptide segnale (cioè fino al nucleotide 116), può essere clonato da mRNA di cellule di placenta utilizzando i primer aventi SEQ ID NO 10 e 11. Detti primer aggiungono siti di restrizione adatti ad un inserimento più facile dell'amplificato nel vettore ricombinante. La sequenza di poliadenilazione è già assente in SEQ ID NO 8.

In un'ulteriore forma di realizzazione preferita della presente invenzione l'enzima lisosomiale è l' α -glucosidasi acida umana (GAA). Il cDNA di detto enzima (SEQ ID NO 12) già delecto della parte codificante il peptide segnale (cioè fino al nucleotide 426), può essere clonato da mRNA di cellule di placenta utilizzando i primer aventi SEQ ID NO 14 e 15. Detti primer aggiungono siti di restrizione adatti ad un inserimento più facile

dell'amplificato nel vettore ricombinante. La sequenza di poliadenilazione è già assente in SEQ ID NO 12.

Il vettore ricombinante per la trasformazione delle piante della presente invenzione può essere un qualsiasi vettore noto adatto alla trasformazione di cellule vegetali e all'espressione di prodotti proteici in esse. Detto vettore può essere tagliato nei siti di restrizione più appropriati ed in esso può essere inserita una cassetta di espressione secondo la presente invenzione.

Vettori adatti alla trasformazione di piante secondo la presente invenzione includono, ma non sono ad essi limitati, i plasmidi Ti di *Agrobacterium* e loro derivati, inclusi sia i vettori di integrazione che quelli binari, i plasmidi pBIB-KAN, pGA471, pEND4K, pGV3850, pMON505 e pBI101. Inclusi tra i vettori della presente invenzione sono anche virus di DNA o RNA vegetali quali, ad esempio, il virus del mosaico del cavolfiore ed il virus del mosaico del tabacco e loro derivati ingegnerizzati geneticamente adatti all'espressione di enzimi lisosomiali. Inoltre, elementi trasponibili possono essere utilizzati



unitamente a qualsiasi vettore per trasferire la cassetta di espressione della presente invenzione all'interno della cellula vegetale.

Vettore preferito ai fini della presente invenzione è il plasmide di espressione pBI101 in cui viene inserita una cassetta di espressione.

La cassetta di espressione secondo la presente invenzione comprende un promotore di un gene vegetale specifico per l'espressione negli organi di riserva del seme e stadio-specifico. Come stadio-specifico si intende un promotore che induca l'espressione del gene da esso controllato in un preciso stadio dello sviluppo del seme.

Un promotore adatto alla realizzazione della presente invenzione è il promotore della globulina basica 7S di soia (SEQ ID NO 6). La cassetta di espressione secondo la presente invenzione comprende inoltre una sequenza di DNA codificante per la sequenza segnale di una proteina vegetale in grado di indirizzare detto enzima lisosomiale agli organi di riserva del seme ed assicurare le modifiche post-traduzionali necessarie per l'espressione dell'enzima in forma enzimaticamente attiva.

Una sequenza segnale adatta alla realizzazione della presente invenzione è la sequenza segnale della globulina basica 7S di soia (SEQ ID NO 7).

La cassetta di espressione secondo la presente invenzione contiene anche una sequenza di DNA codificante un enzima lisosomiale di quelli sopra elencati, privato delle sequenze codificanti la sequenza segnale nativa ed il segnale di poliadenilazione.

La cassetta di espressione della presente invenzione contiene, inoltre, un segnale di poliadenilazione (oppure può essere utilizzato quello già presente nel vettore di espressione).

Gli elementi che costituiscono la cassetta di espressione della presente invenzione, devono essere funzionalmente legati, nell'ordine sopra elencato in direzione 5' -> 3'.

Opzionalmente, la sequenza nucleotidica codificante l'enzima può essere preceduta da una breve sequenza atta a facilitare la purificazione della proteina stessa su colonna di affinità, come ad esempio, l'his 6x tag, FLAG® (Sigma) o GST (Amersham).

In una forma di realizzazione preferita della presente invenzione il vettore deriva dal plasmide

pBI101 (Clontech) in cui viene inserita la cassetta di espressione sopra descritta. Detta cassetta comprende, oltre al DNA codificante l'enzima lisosomiale desiderato, il promotore del gene della globulina basica 7S di soia (PGLOB) (SEQ ID NO 6) ed il DNA codificante per la sequenza segnale del gene della globulina basica 7S di soia (SEQ ID NO 7). Detta cassetta di espressione, inserita nel vettore pBI101 (Clontech) a monte del segnale di poliadenilazione già presente nel vettore, contiene il promotore PGLOB e la sequenza di DNA codificante la sequenza segnale della globulina basica 7S di soia fusa al cDNA dell'enzima lisosomiale umano (ad esempio, GCB SEQ ID NO 1, α -GAL SEQ ID NO 8 e GAA SEQ ID NO 12) da cui sono stati eliminati i nucleotidi codificanti per la sequenza segnale dell'enzima nativo ed eventuali nucleotidi non codificanti l'enzima maturo; cioè, nel caso di SEQ ID NO 1 i nucleotidi da 1 a 57 SEQ ID NO 1, nel caso di SEQ ID NO 8 i nucleotidi da 1 a 116 e, nel caso di SEQ ID NO 12, i nucleotidi da 1 a 426.

Per la realizzazione della presente invenzione sono adatte piante i cui semi abbiano un elevato contenuto proteico. Tra queste sono particolarmente adatte le leguminose, i cereali ed il tabacco.

Come precedentemente indicato, infatti, il contenuto proteico nei semi è di circa il 25-35% nelle leguminose, di circa il 10-15% nei cereali e di circa il 20% nel tabacco.

Nella forma di realizzazione preferita della presente invenzione la pianta utilizzata è la pianta di tabacco.

La trasformazione delle cellule vegetali da cui si rigenera la pianta secondo la presente invenzione può essere effettuata mediante una qualsiasi delle tecniche note all'esperto del ramo, quali la trasformazione di dischi fogliari o di altri tessuti vegetali mediata da *Agrobacterium*, microiniezioni di DNA direttamente nelle cellule vegetali, elettroporazione di DNA nei protoplasti di cellule vegetali, fusione di liposomi o sferoplasti, bombardamento con microproiettili e trasfezione di cellule o tessuti vegetali mediante virus vegetali opportunamente modificati.

L'invenzione può essere realizzata trasformando o trasfettando cellule vegetali con vettori ricombinanti contenenti la cassetta di espressione secondo la presente invenzione e selezionando le cellule trasformate o trasfettate esprimenti l'enzima. Le cellule trasformate possono essere



selezionate mediante marcatori di selezione comunemente noti nello stato della tecnica. Le cellule vegetali trasformate sono selezionate e indotte a rigenerare piante intere fertili in grado di formare semi che esprimono il gene lisosomiale in forma enzimaticamente attiva seguendo metodi agrotecnici noti nello specifico settore. Nella forma di realizzazione preferita della presente invenzione la trasformazione delle cellule vegetali da cui viene rigenerata la pianta è effettuata con cellule di *Agrobacterium* rese competenti mediante elettroporazione. Il ceppo con il vettore viene utilizzato per trasformare dischi fogliari. Dai calli formatisi sui dischi fogliari in presenza dell'antibiotico di selezione viene indotta la formazione prima di germogli e poi di radici. La pianta geneticamente trasformata secondo la presente invenzione è una pianta transgenica stabile la cui informazione genetica, introdotta in seguito alla trasformazione, è presente ed espressa (senza presentare fenomeni di silenziamento genico) nelle generazioni successive.

Il metodo di estrazione dell'enzima prodotto in seme secondo la presente invenzione può essere uno qualsiasi dei metodi standard di estrazione

proteica da tessuti vegetali noto all'esperto della tecnica detto metodo prevede la macinazione del seme in azoto liquido in un tampone appropriato, centrifugazione, recupero del sovranatante, filtraggio e purificazione ulteriore dell'enzima mediante cromatografia normale o di affinità.

In una forma di realizzazione preferita, il tampone di estrazione utilizzato è costituito da: saccarosio, acido ascorbico, Cys-HCl, Tris-HCl, EDTA pH6; la centrifugazione avviene a 2-10°C, preferibilmente a 4°C, a 14.000g per 5-60 minuti, preferibilmente per 30 minuti, la porosità dei filtri è di circa 0.2 µm e la colonna per la cromatografia HPLC è qualsiasi colonna a scambio cationico debole adatta allo scopo. Preferibilmente si utilizza la colonna Resource Q (Pharmacia) a scambio cationico debole con eluizione in tampone fosfato a pH 6 e gradiente NaCl 20-100%. Per la colonna ad affinità gli anticorpi specifici vengono fissati a resine tipo affigel (Biorad) e l'eluizione viene effettuata con etilen glicole.

L'enzima estratto dal seme può essere utilizzato per la preparazione di medicinali adatti ad una terapia enzimatica di sostituzione. E' perciò preferibile che detto enzima abbia una

concentrazione elevata nel seme, cioè tra lo 0.8 e l'1,5%, preferibilmente tra lo 0.8 e l'1%.

Opzionalmente, dato che l'enzima prodotto in pianta potrà contenere glicani N-legati differenti da quelli presenti in un prodotto umano, detto enzima potrà essere modificato chimicamente una volta estratto per evitare eventuali reazioni immunogeniche nel paziente che richieda un'infusione regolare della glicoproteina. Le modifiche in vitro potranno rimuovere il residuo xilosio normalmente legato al mannosio dei glicani prodotti dalle piante, secondo tecniche già utilizzate su proteine prodotte con un sistema basato su cellule di ovario di criceto.

I seguenti esempi intendono fornire una descrizione più dettagliata dell'invenzione senza peraltro limitare ad essi l'oggetto rivendicato.

ESEMPI

Esempio 1:

Costruzione del vettore per l'espressione della glucocerebrosidasi umana in semi di pianta.

Il gene GCB che codifica per la glucocerebrosidasi umana è stato clonato, con tecnica RT-PCR, a partire da RNA messaggero

purificato da placenta con i primer aventi sequenza SEQ ID NO 3 e 4. Il gene è stato isolato, amplificando il DNA avente SEQ ID NO 1 con i primer aventi SEQ ID NO 4 e 5, nella sua parte strutturale priva del peptide segnale (ovvero priva della sequenza segnale del gene umano, cioè dei nucleotidi da 1 a 57 di SEQ ID NO 1) e del sito poly-A (che non viene amplificato dai suddetti primer) e clonato in pGEM®-T (Promega) a formare il plasmide denominato pGEM-GCB (Figura 1). I primer disegnati per l'amplificazione aggiungono all'estremità 5' il sito di restrizione *Sma*I e in 3' il sito di restrizione *Sac*I. Il gene naturale ottenuto, dopo controllo della sequenza che è risultata identica a quella pubblicata (Sorge et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. 82 : 7289-7293), è stato clonato nel vettore denominato pPLT2100, nei siti *Sma*I e *Sac*I, sotto controllo del promotore PGLOB (Figura 2) a formare il plasmide denominato pPLT4000 (Figura 3). Il plasmide risultante pPLT4000 dopo accurato controllo mediante restrizione è stato usato per la trasformazione genetica delle piante.



Esempio 2:

Trasformazione genetica delle piante con il plasmide pPLT4000 e risultati ottenuti in generale

Il plasmide pPLT4000 è stato trasferito in cellule del ceppo di *A. tumefaciens* EHA105, rese competenti, mediante elettroporazione. Il ceppo con il plasmide è stato utilizzato per trasformare circa 300 dischi fogliari di tabacco var. Xanthi. Dai calli formatisi sui dischi fogliari in presenza di kanamicina si è indotta la formazione prima di germogli e poi di radici. Una volta radicate le piante sono state trasferite in vaso e si sono analizzate almeno 150 piante kanamicina resistenti.

Le piante T₀ sono state controllate mediante PCR (Figura 6) e le T₁ mediante analisi Northern (Figura 7) e Western (Figura 8).

Le piante con il gene GCB sotto controllo del promotore PGLOB portano tutte all'accumulo di una proteina, riconosciuta dagli anticorpi specifici per la GCB, di peso molecolare pari a 58 kDa corrispondente alla proteina umana glicosilata (Figura 8). La presenza della proteina ricombinante solo nel seme e non nelle foglie è stata verificata in tutte le piante transgeniche esaminate.

La proteina GCB ricombinante isolata da seme e purificata con tecniche HPLC si è dimostrata identica alla proteina naturale per quanto riguarda il peso molecolare. Il trattamento con enzimi deglicosilanti conferma la presenza di modificazioni post-traduzionali del tutto simili, al momento almeno in termini quantitativi, a quelle presenti nella glucocerebrosidasi nativa (Figura 10).

ESEMPIO 3:

Trasformazione del tabacco mediata da *Agrobacterium tumefaciens*

1° giorno: in 2 ml di LB sterile, è stata inoculata una piccola quantità di *Agrobacterium tumefaciens* del ceppo EHA 105, prelevata da una coltura su piastra petri con un'ansa sterile, in modo da non eccedere nella quantità per evitare successivi problemi di controllo di proliferazione batterica sui dischi fogliari su piastra. Successivamente è stata prelevata da una pianta sana di tabacco varietà Xanthi, una foglia che non presentava alterazioni di sorta e che manifestava per converso condizioni ottimali di turgore. La foglia è stata sciacquata brevemente in acqua bidistillata per

eliminare le impurità superficiali, immersa in una soluzione di sodio ipoclorito 20 % e SDS 0,1 % per 8 minuti, e lasciata asciugare sotto cappa a flusso verticale. Da questo momento, tutte le operazioni sono state eseguite sotto cappa. In particolare la foglia è stata immersa in etanolo 95 % e agitata in modo da bagnarne completamente le due pagine (lasciando fuori dal liquido il picciolo), per 30 - 40 secondi. La foglia è stata poi lasciata asciugare perfettamente.

Con una punzonatrice sterilizzata in etanolo, sono stati ricavati dischetti da tutta la superficie fogliare, facendoli cadere su piastre con MS10 privo di antibiotici; in particolare non sono stati posti più di 30 dischetti per piastra. Successivamente 2 ml di LB + agrobatterio (appena inoculato) sono stati versati sulla piastra, e la sospensione batterica sparsa uniformemente su tutta la piastra con dolce movimento rotatorio, in modo da ottenere una omogenea distribuzione dei batteri tra i dischetti. L'eccesso di LB è stato aspirato con cura con una pipetta. Nello svolgimento di queste operazioni si è sempre avuto cura di eseguire un controllo negativo in parallelo con una piastra a cui non si aggiunge nulla, o solo LB.

Le piastre sono quindi state incubate per 24-48 ore a 28°C, ad illuminazione costante e la crescita dei batteri è stata indicata dalla comparsa di un sottile alone opaco diffuso su tutta la piastra.

2° Giorno

I dischi fogliari(=LD) sono stati trasferiti con cura su una piastra con MS10 + cephotaxime 500 mg/l, e incubati per 6 giorni a 28°C, in illuminazione costante. Questo passaggio determina la inattivazione dell'agrobatterio.

8° giorno

I dischi fogliari sono stati quindi trasferiti con cura su MS10 + cephotaxime 500 mg/l e kanamicina 200 mg/l, ed incubati per 14 giorni a 28°C, in illuminazione costante. Questo passaggio ha determinato la selezione delle cellule trasformate: il gene della resistenza alla kanamicina è infatti portato dal plasmide inserito in Agrobacterium.

22° Giorno

I dischi fogliari che nel frattempo si sono accresciuti, formando callo, sono stati trasferiti con cura su MS10 + cephotaxime 500 mg/l, kanamicina 200 mg/l e carbenicillina 500 mg/l, e incubati per 6 giorni. Questo passaggio determina la eliminazione degli agrobatteri eventualmente



sopravvissuti ai precedenti trattamenti con antibiotico (caso molto frequente).

28° Giorno

I dischi fogliari sono stati nuovamente trasferiti su MS10 + cephotaxime 500 mg/l e kanamicina 200 mg/l, ed incubati fino alla comparsa dei germogli. Quando i germogli presentavano almeno due foglie, sono stati separati dalla massa callosa e trasferiti sul terreno per la radicazione: MS0 + cephotaxime 500 mg/l e kanamicina 200 mg/l.

Al momento della comparsa delle radici, le piantine sono state estratte dalla piastra, liberate dai residui di agar, sciacquate delicatamente in acqua corrente e poste a dimora in piccoli vasi di plastica, in terriccio e sabbia (2:1). Il terreno è stato preventivamente saturato d'acqua, in seguito i vasetti sono stati coperti con coperchi di plastica trasparente per mantenere condizioni di elevata umidità, e sono stati posti in camera di crescita a 25°C, con un periodo giornaliero di illuminazione di 16 ore.

La presenza del costrutto contenente il DNA codificante per la GCB è stata verificata mediante PCR nelle piante T_0 (Figura 6) e, successivamente nelle piante da T_1 a T_5 , la presenza del trascritto

è stata verificata mediante Northern blotting nelle piante T₁ (Figura 7) così come la presenza della proteina mediante Western blotting (Figura 8) e, successivamente nelle piante da T₂ a T₆. La presenza del costrutto nelle generazioni da 0 a 5 e del trascritto, nonché della proteina, nelle generazioni da 1 a 6 dimostrano la stabilità della trasformazione effettuata e l'assenza di fenomeni di silenziamento genico in tutte le generazioni successive alla prima prese in esame.

ESEMPIO 4:

Purificazione della proteina glucocerebrosidasi da tessuti diversi della pianta e verifica del peso molecolare.

L'estrazione di tutte le proteine del seme di tabacco è stata eseguita macinando i semi in azoto liquido in presenza di un tampone di estrazione (0,5 M saccarosio, 0,1% acido ascorbico, 0,1% Cys-HCl, 0,01 M Tris-HCl, 0,05M EDTA pH 6).

La soluzione è stata poi centrifugata per 30 minuti a 14.000 g a 4°C ed è stato recuperato il surnatante con le proteine solubili.

La soluzione è stata poi filtrata con filtri di porosità 0,2 µm e la glucocerebrosidasi parzialmente purificata eliminando le proteine di

peso molecolare inferiore a 30 kDa mediante centrifugazione in colonnina Centricon 30 (Amicon).

La glucocerebrosidasi è stata ulteriormente purificata mediante cromatografia HPLC su colonna Resource Q (Pharmacia) a scambio cationico debole, con eluizione in tampone fosfato pH 6 e gradiente NaCl 20-100%. Il picco corrispondente alla glucocerebrosidasi eluisce a 0,6 M NaCl.

Le frazioni di eluizione sono state riunite e filtrate in Centricon 30 per eliminare il sale. Per l'estrazione della glucocerebrosidasi dalle foglie di tabacco si è proceduto come per l'estrazione da seme fino alla centrifugazione, il surnatante è stato poi addizionato di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 60% e lasciato in agitazione per 60 minuti in ghiaccio.

La soluzione è stata poi centrifugata a 14.000 g per 15 minuti a 4°C ed il precipitato è stato recuperato e poi risospeso in tampone fosfato pH 6,8.

Per la verifica del peso molecolare in SDS-PAGE, al campione di glucocerebrosidasi (20µl) è stato aggiunto il colorante (SDS loading buffer) ed i campioni sono stati caricati su minigel di poliacrilammide al 10%. Le condizioni di corso

utilizzate sono: 10mA iniziali e 20 mA per tutta la corsa, in tampone Tris-glicina 1x. Il gel è stato poi colorato con tecnica Silver staining e il peso molecolare calcolato in riferimento a standard di peso molecolare.

ESEMPIO 5:

Analisi Western delle proteina glucocerebrosidasi prodotta in pianta e deglicosilazione della stessa.

La glucocerebrosidasi purificata da seme secondo l'esempio 5, dopo separazione elettroforetica in gel di acrilammide, è stata trasferita mediante elettroblotting (tampone 25mM Tris, 192 mM Glicina, 20% metanolo, 45 V a 4°C) su membrana di nitrocellulosa (BA85 Schleicher e Schull).

La membrana con la proteina immobilizzata è stata posta in agitazione per 60 minuti in soluzione TBS-T e 5% Skin milk e successivamente, dopo almeno 3 lavaggi in TBS-T, la membrana viene incubata 60' a temperatura ambiente in agitazione con TBS-T, 5% Skin milk e anticorpo primario, anticorpo policlonale di coniglio specifico per la GCB umana, in proporzione 1:2500.



Dopo la reazione con l'anticorpo primario la membrana è stata lavata almeno 3 volte in TBS-T e poi incubata in agitazione per 60' con l'anticorpo secondario (Anti-IgG di coniglio coniugato con perossidasi), sempre in soluzione TBS-T e 5% Skin milk, in proporzione 1:12.000.

Dopo la reazione con l'anticorpo secondario la membrana è stata lavata almeno 3 volte in TBS-T e posta a contatto le soluzioni del kit ECLTM per chemiluminescenza della Amersham.

La membrana è stata poi esposta a contatto con una lastra fotografica (HyperfilmTM MP, Amersham) in camera oscura per tempi variabili (Figura 8).

La deglicosilazione con gli enzimi N-glicosidase A ed F (Calbiochem, Boehringer Mannheim) è stata eseguita utilizzando 10 µl di volume di glicopeptide (10 µg) denaturato in 0,1% SDS portato a ebollizione per 2 min.

A questa soluzione sono stati aggiunti 90 µl di tampone (20 mM tampone fosfato pH 7,2, 50 mM EDTA pH 8, 10 mM sodio azide, 0,5% NP40, 1% β-mercaptoetanolo) e si la soluzione è stata portata ancora una volta a ebollizione per 2 minuti e poi raffreddata a 37°C. Ai 100 µl sono stati aggiunti 1 U di N glicosidase F ed 1 U di N glicosilase A ed

il tutto è stato incubato a 37°C per 18 ore. Il prodotto della reazione è stato analizzato su gel SDS-PAGE e la proteina glucocerebrosidasi rilevata mediante tecnica Western (Figura 10).

Esempio 6:

Verifica dell'attività enzimatica della proteina prodotta e accumulata nel seme

Il saggio enzimatico è stato realizzato in 200 µl di una soluzione 100 mM tampone K fosfato, pH 5, triton x-100 0,15%, Na taurocolato 0,125%, 4-MUG (4 methyl-umbelliferyl glucopyranoside), per 60' a 37°C. La reazione è stata terminata con l'aggiunta di 1 ml di una soluzione 0,1 M glicina, 0,1 M NaOH pH 10 e la lettura effettuata allo spettrofluorimetro con lunghezza d'onda 340 e 448 nm. La curva di taratura dello strumento è stata eseguita utilizzando un prodotto enzimatico commerciale. Per ogni campione il saggio è stato ripetuto in triplo utilizzando 250 ng di proteina parzialmente purificata. I risultati sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1. Attività enzimatica β -glucocerebrosidasica misurata in estratti totali di

proteine da seme di tabacco.

Linea di tabacco	Fluorescenza
WT	$1,4 \pm 0,6$
SG1	$26,1 \pm 1,5$
SG2	$34,7 \pm 1,8$
SG10	$37,0 \pm 1,5$
SG3	$21,4 \pm 0,9$
SG4	$22,5 \pm 1,1$
SG17	$43,9 \pm 1,7$
SG20	$18,8 \pm 1,2$
SG22	$21,8 \pm 1,4$
SG31	$28,9 \pm 1,6$
SGB	$19,2 \pm 1,0$

Esempio 7:

Determinazione quantitativa della proteina

Il calcolo della capacità di accumulo della GCB umana delle varie linee transgeniche è stato eseguito confrontando la quantità di proteina GCB presente nel seme con quantità note di GCB commerciale. La quantità di proteina è stata determinata dopo separazione elettroforetica su gel SDS-PAGE e rivelazione con un anticorpo primario policlonale prodotto in coniglio, specifico per la

GCB umana e con un anticorpo secondario anti-IgG di coniglio coniugato con perossidasi. La banda specifica è stata rilevata con uno scanner e la quantità di proteina è stata determinata confrontando l'intensità della banda con quella di bande contenenti una quantità nota di proteina purificata e presente nello stesso gel a diverse diluizioni. In questo modo sono state identificate linee di tabacco il cui estratto proteico produce per 1 mg di proteine totali estratte dal seme tra 8 e 10 µg di GCB, e cioè corrispondente ad una quantità compresa tra lo 0.8% e l'1% delle proteine totali presenti nel seme.

Esempio 8:

Costruzione del vettore per l'espressione della α -galattosidasi A umana in semi di pianta.

Il gene GLA che codifica per la α -galattosidasi A umana è stato clonato, con tecnica RT-PCR, a partire da RNA messaggero purificato da placenta con i primer aventi sequenza SEQ ID NO 10 e 11. Il gene è stato isolato, nella sua parte strutturale priva anche del peptide segnale (ovvero priva dei nucleotidi da 1 a 116 di SEQ ID NO 8) e del sito poly-A (che non viene amplificato dai



suddetti primer) amplificando il DNA avente SEQ ID NO 8 a partire dal nuclotide 117 con gli stessi primer, e clonato in pGEM®-T (Promega) a formare il plasmide denominato pGEM-GLA. I primer disegnati per l'amplificazione aggiungono all'estremità 5' il sito di restrizione *Bam*HI e all'estremità 3' il sito di restrizione *Eco*RV. Il gene naturale ottenuto, dopo controllo della sequenza, che è risultata identica a quella pubblicata (Tsuji S. et al., 1987, Eur. J. Biochem., 165(2), 275-280) nella parte codificante il peptide maturo, è stato clonato in un vettore analogo a quello denominato pPLT2100 dell'esempio 1 sotto controllo del promotore PGLOB a formare il plasmide denominato pPLT4100 (Figura 4). Il plasmide risultante pPLT4100 dopo accurato controllo mediante restrizione è stato usato per la trasformazione genetica delle piante.

Esempio 9:

Trasformazione genetica delle piante con il plasmide pPLT4100

La trasformazione di piante di tabacco è stata eseguita utilizzando il vettore denominato pPLT4100 con le stesse metodologie utilizzate negli esempi 2 e 3.

La presenza del costrutto contenente il DNA codificante per la GLA è stata verificata mediante PCR nelle piante T₀ (Figura 11).

Esempio 10:

Costruzione del vettore per l'espressione della α -glucosidasi acida umana in semi di pianta.

Il gene GAA, che codifica per la α -glucosidasi acida umana è stato clonato privo della regione codificante il peptide segnale, con tecnica RT-PCR, a partire da RNA messaggero purificato da placenta con i primer aventi sequenza SEQ ID NO 14 e 15. Il gene, nella sua parte strutturale priva anche del peptide segnale (ovvero priva dei nucleotidi da 1 a 426 di SEQ ID NO 12) e del sito poly-A (che non viene amplificato dai suddetti primer) è stato isolato, amplificando il DNA avente SEQ ID NO 12 a partire dal nucleotide 427 con gli stessi primer, e clonato in pGEM®-T (Promega) a formare il plasmide denominato pGEM-GLA. I primer disegnati per l'amplificazione aggiungono alle estremità 5' e 3' il sito di restrizione *EcoRV*. Il gene naturale ottenuto, dopo controllo della sequenza che è risultata identica a quella pubblicata (Hoefsloot L. H. et al., 1988, EMBO JOURNAL 7(6), 1697-1704) nella

patre codificante il peptide maturo, è stato clonato in un vettore analogo a quello denominato pPLT2100 dell'esempio 1 sotto controllo del promotore PGLOB a formare il plasmide denominato pPLT4200 (Figura 5). Il plasmide risultante pPLT4200 dopo accurato controllo mediante restrizione è stato usato per la trasformazione genetica delle piante.

Esempio Comparativo:

Assenza di espressione in seme della GCB utilizzando il promotore 35S del virus del mosaico del cavolfiore

Per verificare il funzionamento del promotore 35S del virus del mosaico del cavolfiore indicato nel brevetto U.S. 5,929,304 come promotore adatto per l'espressione di enzimi lisosomiali, sono state trasformate piante di tabacco utilizzando un vettore ricombinante contenente al SEQ ID NO 1 sotto il controllo del promotore 35S. Le proteine sono state estratte secondo metodi standard ed il prodotto proteico è stato analizzato mediante tecnica Western in chemiluminescenza utilizzando come anticorpo primario un anticorpo policlonale di coniglio specifico per la GCB umana e come anticorpo secondario un anti-IgG di coniglio

coniugato con perossidasi. I risultati, riportati in Figura 11, dimostrano che utilizzando il promotore 35S per l'espressione della glucocerebrosidasi umana non si ottiene accumulo di proteina stabile nel seme.



SEQ ID NO 1:

Sequenza nucleotidica del cDNA del gene GCB.
Sequenza sottolineata: peptide segnale 1-57
Peptide maturo: 58-1548

1 atggc tggcagcctc acaggtttgc ttctacttca ggcagtgtcg tgggcatcag
56 gtgccccgcc ctgcatccct aaaagcttcg gctacagctc ggtggtgtgt
106 gtctgcaatg ccacatactg tgactccttt gaccccccca cctttcctgc
156 ccttggtacc ttacagccgt atgagagtac acgcagtggg cgacggatgg
206 agctgagtat ggggcccac caggctaata acacgggcac aggcctgcta
256 ctgaccctgc agccagaaca gaagttccag aaagtgaagg gatttggagg
306 ggccatgaca gatgctgctg ctctcaacat ccttgccctg tcacccccctg
356 cccaaaattt gctacttaaa tcgtacttct ctgaagaagg aatcgatat
406 aacatcatcc gggtagccat ggccagctgt gactttctca tccgcaccta
456 cacctatgca gacacccctg atgatttcca gttgcacaac ttcagcctcc
506 cagaggaaga taccaagctc aagatacccc tgattcaccg agccctgcag
556 ttggcccagc gtcccgtttc actccttgcc agccctgga catcacccac
606 ttggctcaag accaatggag cgggtgaatgg gaaggggtca ctcaagggac
656 agcccgagga catctaccac cagacctggg ccagatactt tgtgaagtcc
706 ctggatgctt atgctgagca caagttacag ttctgggcag tgacagctga
756 aaatgagcct tctgctgggc tgttgagtgg atacccttc cagtgcctgg
806 gcttcacccc tgaacatcag cgagacttca ttgcccgtga cctaggtcct
856 accctcgcca acagtactca ccacaatgtc cgctactca tgctggatga
906 ccaacgcttg ctgctgcccc actgggcaaa ggtggtactg acagaccag
956 aagcagctaa atatgttcat ggcattgctg tacattggtg cctggacttt
1006 ctggctccag ccaaagccac ctaggggag acacaccgcc tgttccccaa
1056 caccatgctc tttgcctcag aggcctgtgt gggctccaag ttctgggagc
1106 agagtgtgag gctaggctcc tgggatcgag ggatgcagta cagccacagc
1156 atcatcacga acctcctgta ccatgtggtc ggctggaccg actggaacct
1206 tgccctgaac ccgaaggag gacccaattg ggtgcgtaac tttgtcgaca
1256 gtcccatcat ttagacatc accaaggaca cgttttatac acagcccagc
1306 ttctaccacc ttggccactt cagcaagtcc attcctgagg gctcccagag
1356 agtggggctg gttgccagtc agaagaacga cctggacgca gtggcactga
1406 tgcacccga tggctctgct gttgtggtcg tgctaaaccg ctctctaag
1456 gatgtgcctc ttaccatcaa ggatcctgct gtgggcttcc tggagacaat
1506 ctcacctggc tactccattc acacctacct gtggcatcgc cagtga

SEQ ID NO 2: Sequenza amminoacidica codificante GCB umana e
peptide segnale nativo.

Met Ala Gly Ser Leu Thr Gly Leu Leu Leu Leu Gln Ala Val Ser Trp
Ala Ser Gly Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe Gly Tyr Ser Ser
Val Val Cys Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser Phe Asp Pro Pro

Thr Phe Pro Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Glu Ser Thr Arg Ser
Gly Arg Arg Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln Ala Asn His Thr
Gly Thr Gly Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln Lys Phe Gln Lys
Val Lys Gly Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala Ala Leu Asn Ile
Leu Ala Leu Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Leu Lys Ser Tyr Phe
Ser Glu Glu Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val Pro Met Ala Ser
Cys Asp Phe Ser Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp Thr Pro Asp Asp
Phe Gln Leu His Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp Thr Lys Leu Lys
Ile Pro Leu Ile His Arg Ala Leu Gln Leu Ala Gln Arg Pro Val Ser
Leu Leu Ala Ser Pro Trp Thr Ser Pro Thr Trp Leu Lys Thr Asn Gly
Ala Val Asn Gly Lys Gly Ser Leu Lys Gly Gln Pro Gly Asp Ile Tyr
His Gln Thr Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu Asp Ala Tyr Ala
Glu His Lys Leu Gln Phe Trp Ala Val Thr Ala Glu Asn Glu Pro Ser
Ala Gly Leu Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Gln Cys Leu Gly Phe Thr Pro
Glu His Gln Arg Asp Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly Pro Thr Leu Ala
Asn Ser Thr His His Asn Val Arg Leu Leu Met Leu Asp Asp Gln Arg
Leu Leu Leu Pro His Trp Ala Lys Val Val Leu Thr Asp Pro Glu Ala
Ala Lys Tyr Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr Leu Asp Phe Leu
Ala Pro Ala Lys Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg Leu Phe Pro Asn
Thr Met Leu Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser Lys Phe Trp Glu
Gln Ser Val Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met Gln Tyr Ser His
Ser Ile Ile Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly Trp Thr Asp Trp
Asn Leu Ala Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp Val Arg Asn Phe
Val Asp Ser Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp Thr Phe Tyr Lys
Gln Pro Met Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys Phe Ile Pro Glu
Gly Ser Gln Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu Asp
Ala Val Ala Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Leu
Asn Arg Ser Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val
Gly Phe Leu Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu
Trp His Arg Gln

SEQ ID NO 3: primer forward per amplificazione GCB

5': tctagaatggctggcagcctcacaggt

SEQ ID NO 4: primer reverse per amplificazione GCB

5': gtgtggatggacaccgtagcggtcactctcgag

SEQ ID NO 5: primer forward per amplificazione GCB

5': cccgggtgcccgcccctgcacccctaaaagc

SEQ ID NO 6: Promotore PGLOB

1 taaaataatc tatacatata aaaatttgat tttaaaattt tagaaattca tgattttatt
61 tttttttacc agaatccgt taatattggt aaaatattac caactaattt ataaatttta
121 ttttaaggca attaagcatg tttgataaaa tatatatatt gttataaata cttttcaaaa
181 gtataaagtt gatgatggcg tgggtgtaga ttatttttagt tctagggtcg aatgcaagtt
241 ggttttagaca tttagcctta ttcttttttc taacaaaaat aaatgtaaat ggaaaacctt
301 taggaaaaaa aagaaatcaa aattgaaaa atcatccggt ggagtcgaga agcccacacc
361 cacgtgaccc aacaatatta aaataagagt ttgctctaca gtaaatgcga tactttttta
421 ttcaatactt tttccacttc taaaatcttg gagatttgca ccgttaacta attaatgtt
481 atatccaacg gtcctaaaaa aacttggtga ccgtgcctca catttcaact ttgcgcaccc
541 tagaagccgt ctatgttttag gttagtgttt gcaacagttg aagcgcacat ctcaggaggc
601 tacttggtct tgcttttgcg tcttttggtc aatttttcac gtgattttgt tggatgaacac
661 gcgtacttga aacttattat aaattacata attttataag tttcacttct tatataatc
721 ttcattcatg catttataat tttgatgaat aataaagagt ttgttaaaaa atatatatt
781 tcatataata tatagggttt agaagccaa tttttaaaaa aagaataaaa aaataaatag
841 aataaaatcg aaaaaatgaa atgtaaaaaa tttgaggggg acaataaaaa tatgaaagtc
901 tattatttaa attttccatt agaattctat tttccttagt taatatgagc tagccagttg
961 ggagatacac gaaaatgtca tgaaacagtt gcatgtaggg aaattaatgt agtagaggga
1021 tagcaagaca aaaatccaag ccaagctagc tgctcacgcg aactcgatcc acacgtcctt
1081 tacagagttt caaacggatg aaatctgcat ggcagcaac taaagcattg ttctcagctg
1141 ccaagtaccc ctcacactca ccaacccttt gttttctcc ccattgcatg ttaactcaag
1201 tttatccttt ctttgcttct ggaaatttca caagcctcaa acacgtcgac gtccaatctt
1261 gtgaccaaca cggccaaaag aaaagagaat ctcatcccg tcaacttag ccacttaaag
1321 ctgccaacac ggtgatcttt ctctatatat tgtagctctc taacacaacc aacactacca
1381 ttattcaata ttcaaactt gctctatact acacacacta gaagaata

SEQ ID NO 7: sequenza segnale globulina basica di soia 7S

1 atggcttctat cctccactac tttttagccc tctctcttcc ttgctctttt cttttcttct
61 tatccgactc a

SEQ ID NO 8: Sequenza cDNA GLA

Sequenza sottolineata: peptide segnale 21-116

Sequenza codificante peptide maturo 117-1310

1 aatgctgtcc ggtcacctg acaatgcagc tgaggaaccc agaactacat ctgggctgcg
61 cgcttgcgct tcgcttctg gccctcggtt cctgggacat ccctggggct agagcactgg
121 acaatggatt ggcaaggacg cctaccatgg gctggctgca ctgggagcgc ttcattgtga
181 accttgactg ccaggaagag ccagattcct gcatcagtga gaagctcttc atggagatgg
241 cagagctcat ggtctcagaa ggctggaagg atgcaggta tgagtacctc tgcattgatg
301 actggtggat ggctcccaa agagattcag aaggcagact tcaggcagac cctcagcgct
361 ttcctcatgg gattcgccag ctagtcaatt atgttcacag caaaggactg aagctaggga
421 tttatgcaga tgttggaat tttggcagat gttataagca catgtccttg gccctgaata
481 acattgatgc ccagaccttt gctgactggg gagtagatct gctaaaattt gatgggtgtt
541 actgtgacag tttggaaaat ttggcagatg gttataagca catgtccttg gccctgaata
601 ggactggcag aagcattgtg tactcctgtg agtggcctct ttatatgtgg ccctttcaaa
661 agcccaatta tacagaaatc cgacagtact gcaatcactg gcgaaatttt gctgacattg
721 atgattcctg gaaaagtata aagagtatct tggactggac atcttttaac caggagagaa
781 ttgttgatgt tgctggacca gggggttgga atgaccaga tatgttagtg attggcaact

841 ttggcctcag ctggaatcag caagtaactc agatggccct ctgggctatc atggctgctc
901 ctttattcat gtctaatacgc ctccgacaca tcagccctca agccaaagct ctccttcagg
961 ataaggacgt aattgccatc aatcaggacc ccttgggcaa gcaagggtac cagcttagac
1021 agggagacaa ctttgaagtg tgggaacgac ctctctcagg cttagcctgg gctgtagcta
1081 tgataaaccg gcaggagatt ggtggacctc gctcttatac catcgagtt gcttccttgg
1141 gtaaaggagt ggcctgtaat cctgcctgct tcatcacaca gctcctccct gtgaaaagga
1201 agctagggtt ctatgaatgg acttcaaggt taagaagtca cataaatccc acaggcactg
1261 ttttgcttca gctagaaaat acaatgcaga tgtcattaaa agacttactt taaaatgtt

SEQ ID NO 9: Sequenza amminoacidica codificante GLA e
peptide segnale nativo

Thr Met Gln Leu Arg Asn Pro Glu Leu His Leu Gly Cys Ala Leu Ala
Leu Arg Phe Leu Ala Leu Val Ser Trp Asp Ile Pro Gly Ala Arg Ala
Leu Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His Trp
Glu Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys
Ile Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu
Gly Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp
Met Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln
Arg Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser Lys
Gly Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala
Gly Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe
Ala Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp
Ser Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu
Asn Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr
Met Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys
Asn His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile
Lys Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp
Val Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly
Asn Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp
Ala Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile
Ser Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile
Asn Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp
Asn Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala Val
Ala Met Ile Asn Arg Gln Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile
Ala Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe
Ile Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp
Thr Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu
Gln Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu

SEQ ID NO 10: Primer forward per amplificazione GLA

5': ggatccctggacaatggattggcaaggac

SEQ ID NO 11: Primer reverse per amplificazione GLA

5': gtctacagtaattttctgaatgaaattctatag



SEQ ID NO 12: cDNA GAA.

Sequenza sottolineata: peptide segnale 220-426

Sequenza codificante il peptide maturo 427-3075

1 cagttgggaa agctgaggtt gtcgccgggg cgcggggtgg aggtcgggga tgaggcagca
61 ggtaggacag tgacctcggt gacggaagg accccggcca cctctaggtt ctctcgtcc
121 gcccgttggt cagcgaggga ggctctgggc ctgccgcagc tgacggggaa actgaggcac
181 ggagcggggc tgtaggagct gtccaggcca tctccaacca tgaggagtga gcacccggcc
241 tgctcccacc ggctcctggc cgtctgcgcc ctcgtgtcct tggcaaccgc tgactcctg
301 gggcacatcc tactccatga tttctgctg gttccccgag agctgagtgg ctcctcccca
361 gtcctggagg agactcacc agctcaccag cagggagcca gcagaccagg gccccgggat
421 gcccaggcac accccgggc tcccagagca gtgcccacac agtgcgacgt ccccccaac
481 agccgcttcg attgcgcccc tgacaaggcc atcaccagg aacagtgcga ggccccgggc
541 tgctgttaca tccctgcaaa gcaggggctg cagggagccc agatggggca gccctggtgc
601 ttcttcccac ccagctaccc cagctacaag ctggagaacc tgagctcctc tgaaatgggc
661 tacacggcca ccccgacccg taccaccccc accttcttcc ccaaggacat cctgaccctg
721 cggctggacg tgatgatgga gactgagaac cgcctccact tcacgatcaa agatccagct
781 aacaggcgct acgaggtgcc cttggagacc ccgctgttcc acagccgggc accgtcccca
841 ctctacagcg tggagttctc cgaggagccc ttccgggtga tctgtcaccg gcagctggac
901 ggccgctgct tgctgaacac gacggtggcg cccctgttct ttgcggacca gttccttcag
961 ctgtccacct cgtgccttc gcagtatatc acaggcctcg ccgagcacct cagtccctg
1021 atgtcagca ccagctggac cagatcacc ctgtggaacc gggaccttgc gcccacgccc
1081 ggtgcgaacc tctacgggtc tcacctttc tacctggcgc tggaggacgg cgggtcggca
1141 cacggggtgt tctgctaaa cagcaatgcc atggatgtgg tctgcagcc gagcctgccc
1201 cttagctgga ggtcgacagg tgggatcctg gatgtctaca tcttctggg cccagagccc
1261 aagagcgtgg tgcagcagta cctggacgtt gtgggatacc cgttcatgcc gccatactgg
1321 ggcctgggct tccacctgtg ccgctggggc tactcctcca ccgctatcac ccgccaggtg
1381 gtggagaaca tgaccagggc ccacttcccc ctggacgtcc aatggaacga cctggactac
1441 atggactccc ggagggactt caggttcaac aaggatggct tccgggactt cccggccatg
1501 gtgcaggagc tgcaccaggg cggccggcgc tacatgatga tctgtgatcc tgccatcagc
1561 agctcggggc ctgcccgggag ctacaggccc tacgacgagg gtctgcggag gggggttttc
1621 atcaccaacg agaccggcca gccgctgatt ggggaaggtat ggcccggtc cactgccttc
1681 cccgacttca ccaaccocac agccctggcc tgggtgggag acatggtggc tgagttccat
1741 gaccaggtgc ccttcgacgg catgtggatt gacatgaacg agccttccaa cttcatcaga
1801 ggctctgagg acggctgccc caacaatgag ctggagaacc caccctacgt gcctggggtg
1861 gttgggggga cctccaggc ggccaccatc tgtgcctcca gccaccagt tctctccaca
1921 cactacaacc tgcacaacct ctacggcctg accgaagcca tgcctccca cagggcgctg
1981 gtgaaggctc gggggacacg cccatttgtg atctcccgt cggagcagct cgcctcctc
2041 cgatacgccg gccactggac gggggacgtg tggagctcct tggtcggggc cgacgtctgc
2101 gtgccagaaa tcctgcagtt taacctgctg ggggtgcctc tggtcggggc gggggccttc
2161 ggcttctctg gcaacacctc agaggagctg tgtgtgcgct ggaccagct gggggccttc
2221 taccoccttca tgcggaacca caacagcctg ctcatgtctc cccaggagcc gtacagcttc
2281 agcgagcccg cccagcaggc catgaggaag gccctcacc tgcgctacgc actcctcccc
2341 cactcttaca cactgttcca ccaggcccac gtccgggggg agaccgtggc ccggcccttc
2401 ttcttgaggt tccccagga ctctagcacc tggactgtgg accaccagct cctgtggggg
2461 gaggccctgc tcatcaccac agtgcctcag gccgggaagg ccgaagtgc cagcctccca
2521 cccttgggca catggtacga cctgcagacg gtgccaatag aggccttgg cagcctccca
2581 ccccccctg cagctccccg tgagccagcc atccacagc aggggcagtg ggtgacgtg
2641 ccggccccc tggacacat caacgtccac ctccgggctg ggtacatcat cccctgcag
2701 ggccctggcc tcacaaccac agagtccgc cagcagcca tggccctggc tgtggccctg

```

2761 accaaggggtg gagaggcccg aggggagctg ttctgggacg atggagagag cctggaagtg
2821 ctggagcgag gggcctacac acagggtcatc ttctgggcca ggaataacac gatcgtgaat
2881 gagctggtac gtgtgaccag tgagggagct ggcctgcagc tgcagaaggt gactgtcctg
2941 ggcgtggcca cggcgcccca gcaggctctc tccaacgggt tccctgtctc caacttcacc
3001 tacagccccg acaccaaggt cctggacatc tgtgtctcgc tgttgatggg agagcagttt
3061 ctgctcagct ggtgttagcc gggcggagtg tgttagtctc tccagagggg ggctgggtcc
3121 ccagggaagc agagcctgtg tgcgggcagc agctgtgtgc gggcctgggg gttgcatgtg
3181 tcacctggag ctgggcacta accattccaa gccgccgcat cgcttgtttc cacctcctgg
3241 gccggggctc tggcccccaa cgtgtctagg agagctttct ccctagatcg cactgtgggc
3301 cggggcctgg agggctgctc tgtgttaata agattgtaag gtttgccctc ctcacotgtt
3361 gccggcatgc gggtagtatt agccaccccc ctccatctgt tcccagcacc ggagaagggg
3421 gtgctcaggt ggaggtgtgg ggtatgcacc tgagctcctg cttcgcgcct gctgctctgc
3481 cccaacgcga ccgcttcccc gctgcccaga gggctggatg cctgccggtc cccgagcaag
3541 cctgggaact caggaaaatt cacaggactt gggagattct aaatcttaag tgcaattatt
3601 ttaataaaaag gggcatttgg aatc

```

SEQ ID NO 13: Sequenza amminoacidica GAA umana e peptide segnale nativo

```

Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr Gln Cys Asp Val Pro
Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys Ala Ile Thr Gln Glu
Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro Ala Lys Gln Gly Leu
Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe Phe Pro Pro Ser Tyr
Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser Glu Met Gly Tyr Thr
Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe Pro Lys Asp Ile Leu
Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu Asn Arg Leu His Phe
Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu Val Pro Leu Glu Thr
Pro Arg Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu Tyr Ser Val Glu Phe
Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val His Arg Gln Leu Asp Gly Arg
Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe Phe Ala Asp Gln Phe
Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr Ile Thr Gly Leu Ala
Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser Trp Thr Arg Ile Thr
Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly Ala Asn Leu Tyr Gly
Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly Gly Ser Ala His Gly
Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val Val Leu Gln Pro Ser
Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile Leu Asp Val Tyr Ile
Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln Gln Tyr Leu Asp Val
Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly Leu Gly Phe His Leu
Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr Arg Gln Val Val Glu
Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val Gln Trp Asn Asp Leu
Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe Asn Lys Asp Gly Phe
Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His Gln Gly Gly Arg Arg
Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser Ser Gly Pro Ala Gly
Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg Gly Val Phe Ile Thr
Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val Trp Pro Gly Ser Thr
Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu Ala Trp Trp Glu Asp
Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe Asp Gly Met Trp Ile
Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly Ser Glu Asp Gly Cys
Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val Pro Gly Val Val Gly
Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser Ser His Gln Phe Leu
Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly Leu Thr Glu Ala Ile

```

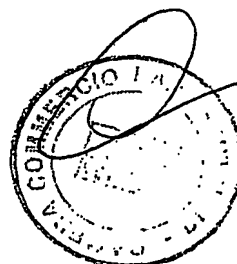
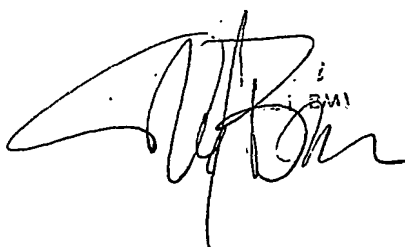
Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly Thr Arg Pro Phe Val
Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg Tyr Ala Gly His Trp
Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu Ala Ser Ser Val Pro
Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro Leu Val Gly Ala Asp
Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu Leu Cys Val Arg Trp
Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg Asn His Asn Ser Leu
Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser Glu Pro Ala Gln Gln
Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala Leu Leu Pro His Leu
Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly Glu Thr Val Ala Arg
Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser Thr Trp Thr Val Asp
His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile Thr Pro Val Leu Gln
Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro Leu Gly Thr Trp Tyr
Asp Leu Gln Thr Val Pro Ile Glu Ala Leu Gly Ser Leu Pro Pro Pro
Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser Glu Gly Gln Trp Val
Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val His Leu Arg Ala Gly
Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr Thr Thr Glu Ser Arg
Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr Lys Gly Gly Glu Ala
Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser Leu Glu Val Leu Glu
Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala Arg Asn Asn Thr Ile
Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly Ala Gly Leu Gln Leu
Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala Pro Gln Gln Val Leu
Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr Ser Pro Asp Thr Lys
Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly Glu Gln Phe Leu Val
Ser Trp Cys

SEQ ID NO 14: Primer forward per amplificazione GAA

5': gatatctgcacacccccggccgtcccag

SEQ ID NO 15: Primer reverse per amplificazione GAA

5': gtcaaagagcagtcgaccacaatcctatag



RM 2002 A 000115

RIVENDICAZIONI

1. Pianta geneticamente trasformata in grado di produrre un enzima lisosomiale di origine umana o animale caratterizzata dal fatto che:

-detta pianta è trasformata mediante l'uso di un vettore di espressione comprendente:

a. un promotore di un gene vegetale specifico per l'espressione negli organi di riserva del seme e stadio-specifico;

b. una sequenza di DNA codificante la sequenza segnale di una proteina vegetale in grado di indirizzare detto enzima lisosomiale agli organi di riserva del seme ed assicurare le modifiche post-traduzionali necessarie per l'espressione dell'enzima in forma attiva;

c. una sequenza di DNA codificante detto enzima lisosomiale privo della sequenza segnale nativa;

-detto enzima è espresso nei tessuti di riserva del seme in forma enzimaticamente attiva nella quantità di almeno lo 0.8% delle proteine totali del seme.

2. Pianta secondo la rivendicazione 1, caratterizzata dal fatto che il vettore di espressione è un plasmide.



3. Pianta secondo le rivendicazioni 1 o 2, caratterizzata dal fatto che il promotore proviene dal gene della globulina 7S di soia.

4. Pianta secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, caratterizzata dal fatto che la sequenza di DNA codificante la sequenza segnale proviene dal gene della globulina 7S di soia ed è fusa alla sequenza codificante la parte strutturale dell'enzima lisosomiale maturo privo della sequenza segnale nativa.

5. Pianta secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui l'enzima lisosomiale espresso in forma enzimaticamente attiva nei tessuti di riserva del seme è :

α -N-acetilgalattosamminidasi, lipasi acida, aril solfatasi A, aspartilglicosamminidasi, ceramidasi, α -fucosidasi, α -galattosidasi A, β -galattosidasi, galattosilceramidasi, glucocerebrosidasi, α -glucosidasi, β -glucuronidasi, eparin N-solfatasi, β -esosamminidasi, iduronato solfatasi, α -L-iduronidasi, α -mannosidasi, β -mannosidasi, sialidasi e sfingomielinasi.

6. Pianta secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5 in cui detta pianta è una leguminosa, un cereale o tabacco.

7. Metodo per la produzione della pianta geneticamente trasformata in grado di produrre un enzima lisosomiale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6, caratterizzato da fatto che:

-cellule vegetali vengono trasformate mediante l'uso di un vettore di espressione comprendente:

a. un promotore di un gene vegetale specifico per l'espressione negli organi di riserva del seme e stadio-specifico;

b. una sequenza di DNA codificante la sequenza segnale di una proteina vegetale in grado di indirizzare detto enzima lisosomiale agli organi di riserva del seme ed assicurare le modifiche post-traduzionali necessarie per l'espressione dell'enzima in forma attiva;

c. una sequenza di DNA codificante detto enzima lisosomiale privo della sequenza segnale nativa;

-dette cellule vengono utilizzate per rigenerare

detta pianta trasformata.

8. Metodo secondo la rivendicazione 7 in cui detta pianta è una leguminosa, un cereale o tabacco.

9. Seme di pianta geneticamente modificata in grado di esprimere un enzima lisosomiale caratterizzato dal fatto che:

-detto seme contiene un vettore di espressione comprendente:

a. un promotore di un gene vegetale specifico per l'espressione negli organi di riserva del seme e stadio-specifico;

b. una sequenza di DNA codificante la sequenza segnale di una proteina vegetale in grado di indirizzare detto enzima lisosomiale agli organi di riserva del seme ed assicurare le modifiche post-traduzionali necessarie per l'espressione dell'enzima in forma attiva;

c. una sequenza di DNA codificante detto enzima lisosomiale privo della sequenza segnale nativa;

-detto enzima è contenuto nei tessuti di riserva del seme in forma enzimaticamente attiva nella

quantità di almeno lo 0.8% delle proteine totali del seme.

10. Seme secondo la rivendicazione 9 caratterizzato dal fatto che il vettore di espressione è un plasmide.

11. Seme secondo le rivendicazioni 9 o 10, caratterizzato da fatto che il promotore proviene dal gene della globulina 7S di soia.

12. Seme secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 9 a 11, caratterizzato dal fatto la sequenza di DNA codificante la sequenza segnale proviene dal gene della globulina 7S di soia ed è fusa alla sequenza codificante la parte strutturale dell'enzima lisosomiale maturo privo della sequenza segnale nativa.

13. Seme secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 9 a 12 caratterizzato dal fatto che l'enzima lisosomiale espresso in forma enzimaticamente attiva nei tessuti di riserva del seme è :

α -N-acetilgalattosamminidasi, lipasi acida, l'aril



solfatasi A, aspartilglicosamminidasi, ceramidasi, α -fucosidasi, α -galattosidasi A, β -galattosidasi, galattosilceramidasi, glucocerebrosidasi, α -glucosidasi, β -glucuronidasi, eparin N-solfatasi, β -esosamminidasi, iduronato solfatasi, α -L-iduronidasi, α -mannosidasi, β -mannosidasi, sialidasi e sfingomielinasi.

14. Seme secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 9 a 13 in cui detto seme è di leguminosa, di cereale o di tabacco.

15. Metodo per la produzione del seme secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 9 a 14, caratterizzato da fatto che:

-cellule vegetali vengono trasformate mediante l'uso di un vettore di espressione comprendente:

a. un promotore di un gene vegetale specifico per l'espressione negli organi di riserva del seme e stadio-specifico;

b. una sequenza di DNA codificante la sequenza segnale di una proteina vegetale in grado di indirizzare detto enzima lisosomiale agli organi di riserva del seme ed assicurare le

modifiche post-traduzionali necessarie per l'espressione dell'enzima in forma attiva;
c. una sequenza di DNA codificante detto enzima lisosomiale privo della sequenza segnale nativa;

-dette cellule vengono utilizzate per rigenerare piante trasformate in grado di produrre detti semi.

16. Metodo secondo la rivendicazione 15 in cui detto seme è di leguminosa, di cereale o di tabacco.

17. Metodo di estrazione e purificazione dell'enzima lisosomiale in forma attiva contenuto nel seme secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 9 a 14, caratterizzato dal fatto che:

- a. detto seme viene macinato in azoto liquido in presenza di un tampone di estrazione;
- b. la soluzione ottenuta viene centrifugata;
- c. il sovranatante viene recuperato e filtrato con filtri a porosità adatta a seconde della dimensione dell'enzima;
- d. l'enzima parzialmente purificato viene ulteriormente purificato mediante cromatografia HPLC.

18. Uso del seme secondo le rivendicazioni da 9 a 14, per la preparazione di medicinali per terapie enzimatiche di sostituzione.

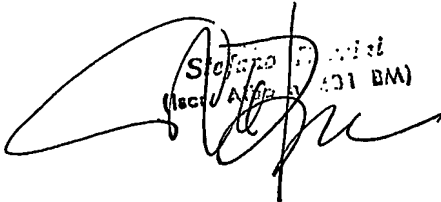
19. Uso del seme secondo la rivendicazione 18 per la preparazione di un medicinale per una terapia enzimatica di sostituzione della malattia di Gaucher.

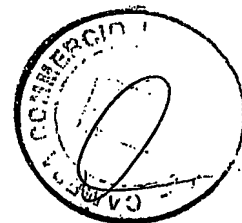
20 . Uso del seme secondo la rivendicazione 18 per la preparazione di un medicinale per una terapia enzimatica di sostituzione della malattia di Andereson-Fabry.

21 . Uso del seme secondo la rivendicazione 18 per la preparazione di un medicinale per una terapia enzimatica di sostituzione della malattia di Pompe.

22. Uso del seme secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 9 a 14 come mezzo di immagazzinamento e conservazione di un enzima lisosomiale in forma enzimaticamente attiva.

p.p. Plantechno S.r.l.


Stefano
(iscr. Albo) 001 BM)



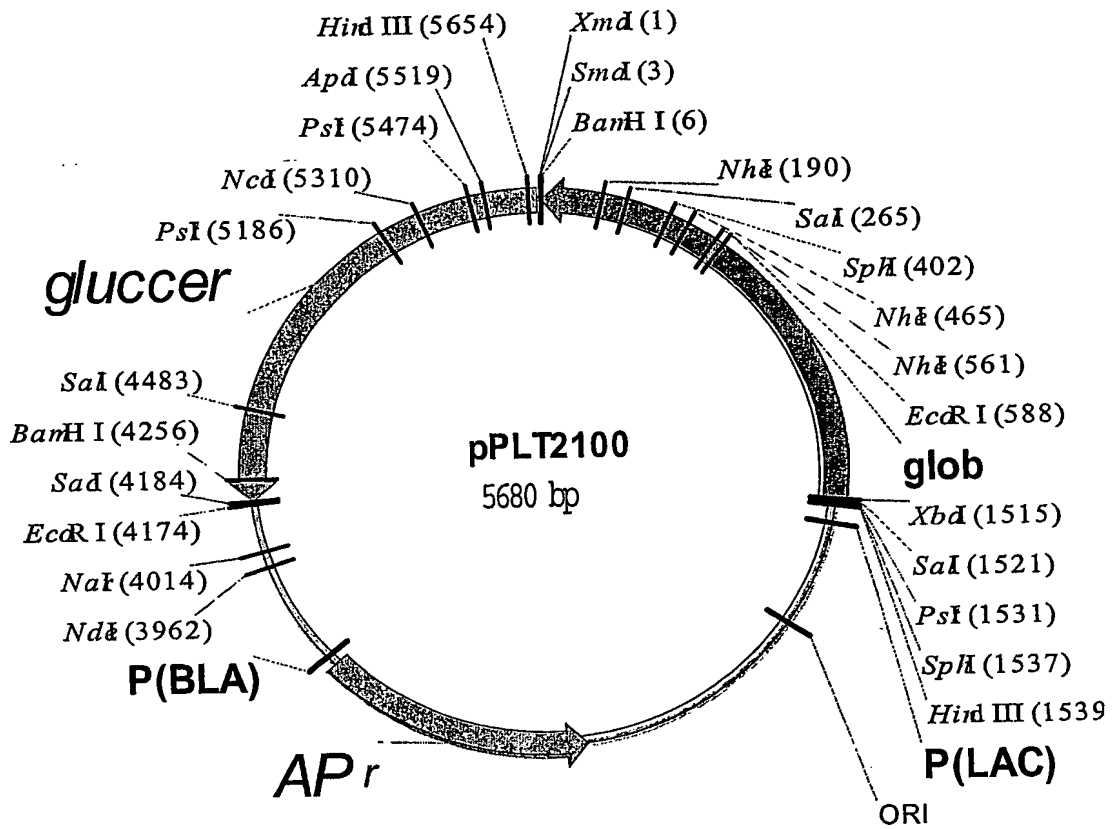


Figura 2



Stefano Rinaldi
(Isr. Albo n. 431 BM)

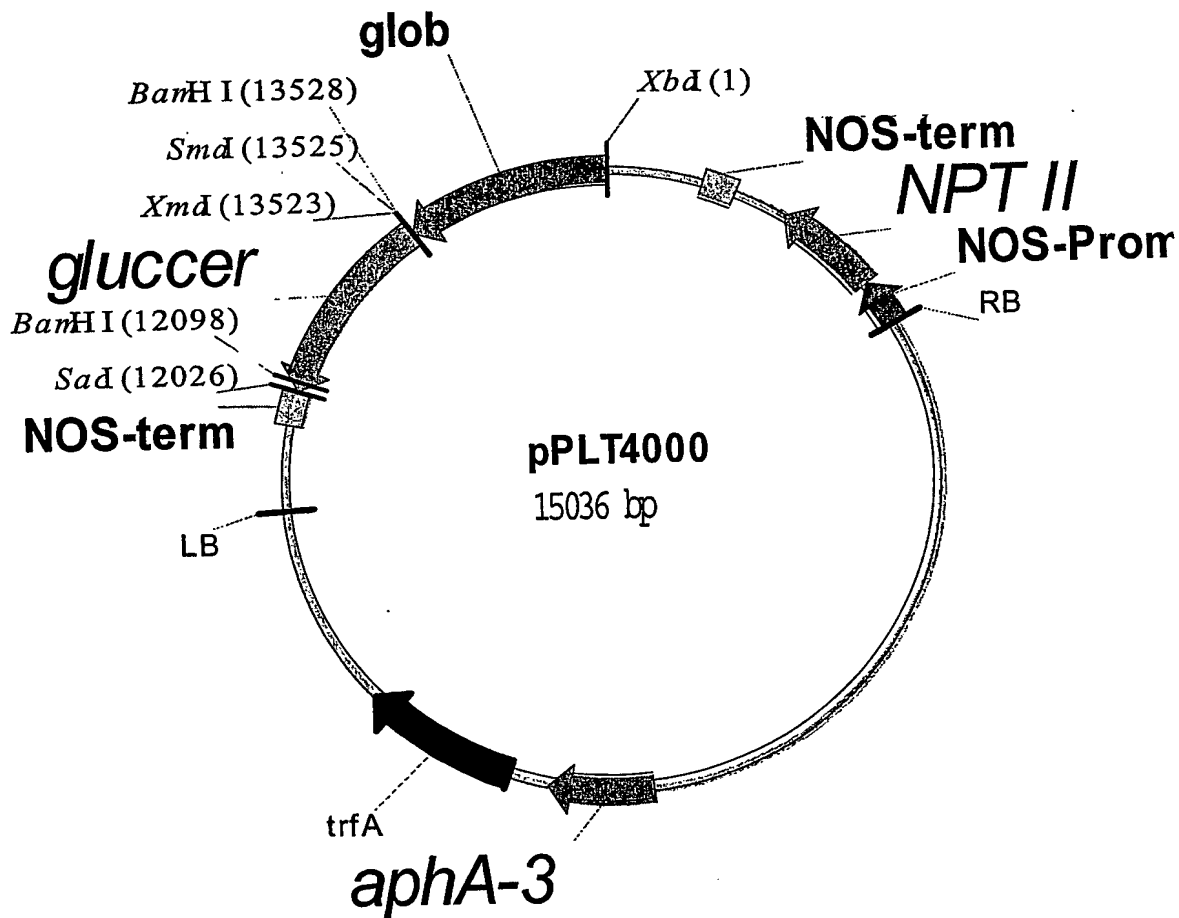
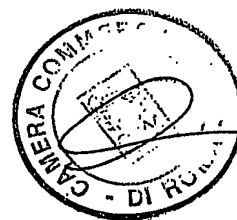


Figura 3



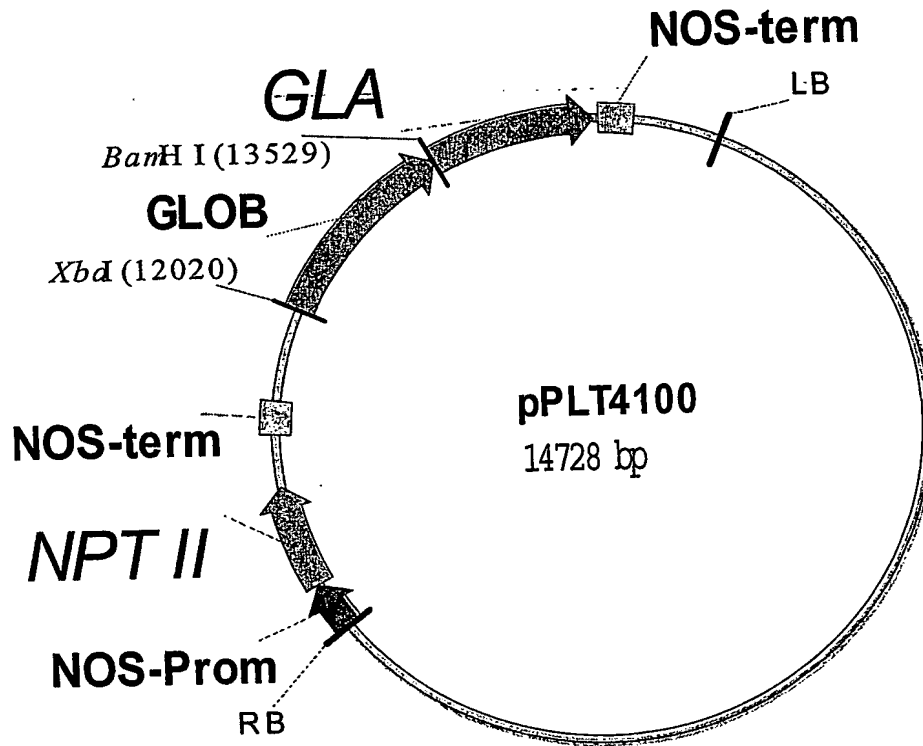
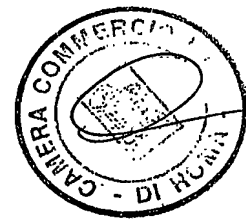


Figura 4



p.p. Plantechno S.r.l.

Stefano Borrini
Reg. Trib. n. 431 BM)

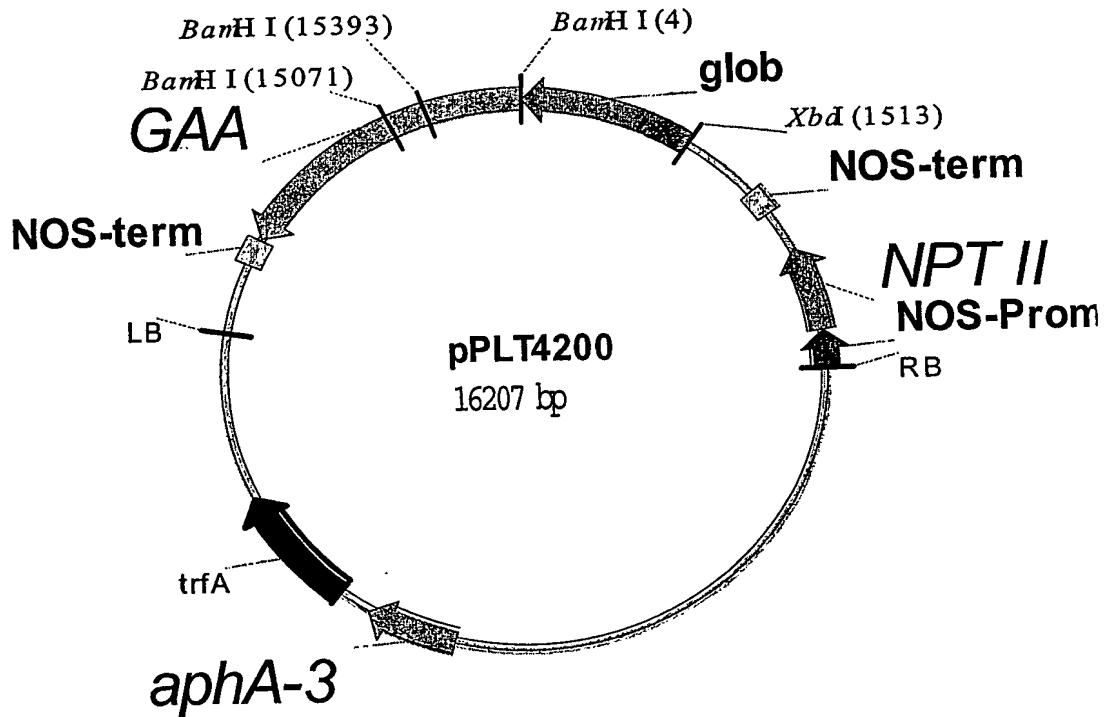


Figura 5



p.p. Plantechno S.r.l.

Stefano Borini
(loc. A/ba n. 431 BA)

RM 2002 A 000115

6/8

S 1 2 3 4 5 6 7 8 9 C

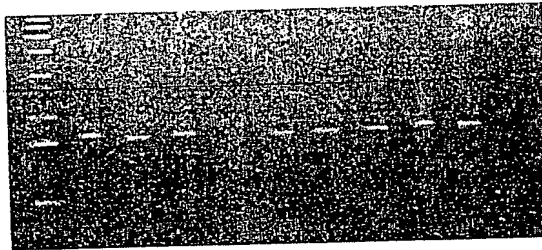


Figura 6

1 2 3 4 5 6 7 8 C- C+

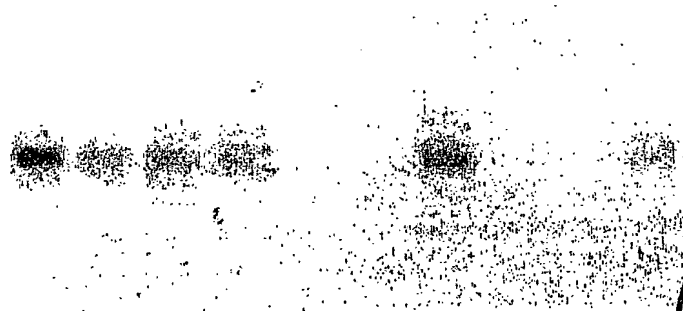


Figura 7



p.p. Plantechno S.r.l.

Stefano Byrrini
(Legg. Albo n. 431 BM)

RM 2002 A 000115

7/8

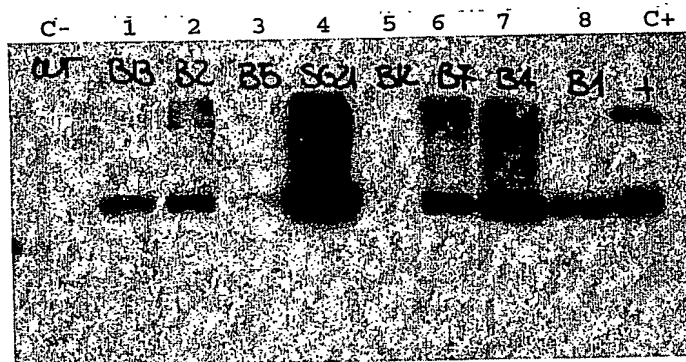


Figura 8

I II III IV V VI C+ C-



I II III IV V VI Song +

Figura 9



p.p. Plantechno S.r.l.

Stefano Borrini
(Leg. Albo n. 431 BM)

RM 2002 A 000115

8/8

1 2 3 4

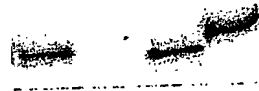


Figura 10

S C 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

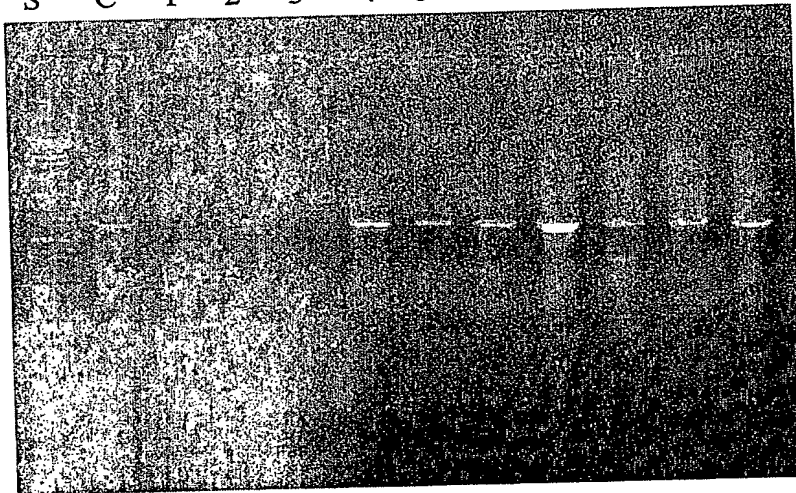


Figura 11

1 2 3 4 5 6 7 8

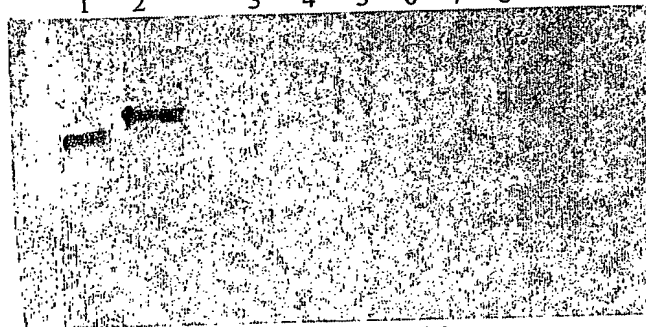
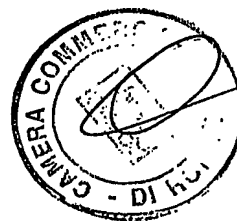


Figura 12



Stefano Corini
(Legg. Albo n. 431 RM)

p.p. Plantechno S.r.l.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.